

**Strategien für das Screening und die
Identifizierung organischer Spurenstoffe in
Wasser mittels HPLC-QTOF-MS**

Kumulative Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

DOCTOR RERUM NATURALIUM

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Fakultät Nachhaltigkeit (Institut für Umweltchemie)

der Universität Leuphana Lüneburg

von Alexander Müller

Schemmerhofen-Alberweiler

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Wolfgang K.L. Ruck
(Institut Umweltchemie, Universität Leuphana Lüneburg)

Hon.-Prof. Dr. Ralf Ebinghaus
(Institut Umweltchemie, Universität Leuphana Lüneburg, Leiter der
Abteilung Umweltchemie, Institut für Küstenforschung des GKSS-
Forschungszentrums in Geesthacht)

Disputation: Lüneburg, 21.November 2012

*Meinem Bruder Michael
und meinen Eltern Rose und Anton*

Strategien für das Screening und die Identifizierung organischer Spurenstoffe in Wasser mittels HPLC-QTOF-MS

I. Kurzfassung

Der vielfältige Einsatz von unterschiedlichen organischen Substanzen im Haushalt, in der Landwirtschaft und der Industrie hat zur Folge, dass diese in die aquatische Umwelt gelangen können. Zur Sicherung der Trinkwasserqualität ist daher eine ständige und umfassende Überwachung der zur Trinkwassergewinnung genutzten Wasserressourcen hinsichtlich organischer Spurenstoffe und deren Verhalten in der Trinkwasseraufbereitung notwendig. Neben dem Screening auf bekannte Substanzen (Target-Screening) erfolgt hierbei zunehmend auch ein Screening auf nicht erwartete bzw. unbekannte Substanzen (Non-Target-Screening).

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit einem neuen Ansatz der Auswertung von Daten des Non-Target-Screenings mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (Kapitel 3, **Publikation I**). Das beschriebene Konzept ermöglicht durch die vergleichende Betrachtung von Proben anhand aller ihrer aus den Full-Scan-Daten ermittelten Komponenten eine Fokussierung auf wenige für die Fragestellung des Screenings relevante Kontaminanten. Hierzu werden Schnittmengen für alle Komponenten gemäß der räumlichen, zeitlichen oder prozessbezogenen Beziehungen zwischen den einzelnen Proben gebildet. Anschließend erfolgt die Identifizierung der ermittelten relevanten Substanzen mit Hilfe der neu erstellten Online-Datenbank DAIOS (Database Assisted Identification of Organic Substances) und strukturaufklärenden Experimenten. Das Datenbankkonzept DAIOS beinhaltet spezielle Funktionen, wie beispielsweise Fragmentationensuche mit variabler Massengenauigkeit oder die Verknüpfung von Substanzeinträgen mit den dazugehörigen Transformationsprodukten, welche die Effizienz der Datenbankabfrage steigern. Im angegebenen Beispiel konnte mit Hilfe der beschriebenen Vorgehensweise in einem Schritt der Einfluss von über 1700 detektierten Probenkomponenten eines Deponiesickerwassers auf ihre Relevanz für das Trinkwasser geprüft werden. Dieser neue Ansatz eines Non-Target-Screenings wurde in der Zwischenzeit schon in verschiedenen Gebieten der Umweltanalytik, wie beispielsweise in der Gewässer- und Grundwasserüberwachung oder bei Altlastensanierungen, erfolgreich angewendet.

Kann die Ursache einer Kontamination eingegrenzt werden, vereinfacht sich die Vorgehensweise des Non-Target-Screenings, wie das Beispiel einer auffällig rot gefärbten Wasserprobe aus einem Grundwasserbeobachtungsbrunnen zeigt (Kapitel 4, **Publikation II**). Die charakteristische Probenfärbung legte die Vermutung nahe, dass es sich möglicherweise um eine Kontamination mit einem oder mehreren Markierungsfarbstoffen handeln könnte. Bei dem Screening mittels HPTLC/AMD konnte unter Verwendung von Referenzsubstanzen eine der sechs fluoreszierenden Banden als Rhodamin B nachgewiesen werden. Jedoch erst die Kopplung der HPTLC mit der

HPLC-MS kombiniert mit Derivatisierungsreaktionen auf der HPTLC-Platte ermöglichte die Identifizierung der de-ethylierten Abbauprodukte von Rhodamin B als Ursache der fünf weiteren HPTLC-Banden. Die abschließende Quantifizierung ergab eine Konzentration von $83 \mu\text{g L}^{-1}$ Rhodamin B in der Wasserprobe.

Im zweiten Teil dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf der Erkennung und Identifizierung gebildeter Oxidationsnebenprodukte bekannter Wasserkontaminanten (Kapitel 5, **Publikation III**). Nachdem Benzotriazol und Tolyltriazol (eine Mischung der Isomeren 4-Methyl-1H-benzotriazol und 5-Methyl-1H-benzotriazol) als dauerhafte Kontaminanten der Donau und in 34 % bzw. 18 % der 74 Grundwasserbeobachtungsbrunnen im Wasserschutzgebiet Donauried-Hürbe nachgewiesen wurden (Kapitel 11.2, **Publikation V**), erfolgte die Untersuchung ihres Verhaltens in der Trinkwasseraufbereitung des Wasserwerks Langenau. Nur beim Aufarbeitungsschritt der Ozonung konnte eine signifikante Entfernung dieser Substanzen (ca. 80 - 90 %, vgl. Anhang, Abbildung 11-1) festgestellt werden. Da bekannt war, dass durch den Einsatz von Ozon bei der Trinkwasseraufbereitung sich eventuell trinkwasserrelevante Oxidationsnebenprodukte bilden können (Schmidt und Brauch, 2008), wurde zur ihrer Erkennung eine Vorgehensweise erarbeitet. Am Beispiel der Untersuchung des Verhaltens von 4- und 5-Methyl-1H-benzotriazol während der Ozonung bei der Aufbereitung von Oberflächenwasser zu Trinkwasser wurde diese Strategie erfolgreich bestätigt. Der grundlegende Ansatz war, mögliche Oxidationsnebenprodukte der beiden Ausgangssubstanzen im Laborversuch zu identifizieren (Konzentrationsbereich mg L^{-1}) und diese anschließend im großtechnischen Prozess (Konzentrationsbereich ng L^{-1}) nachzuweisen.

Nach der Durchführung von Ozonungsexperimenten mit Reinsubstanzen im Labormaßstab erfolgten die Analysen der Reaktionslösungen mit unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten auf Oxidationsnebenprodukte mit Hilfe eines Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometers. Zur Erkennung der Oxidationsnebenprodukte wurden unterschiedliche Methoden angewendet: Zielgerichtetes Untersuchen der Datensätze auf postulierte Oxidationsprodukte mittels extrahierter Ionenchromatogramme, Vergleichen von Chromatogrammen (z. B. UV/VIS) der unterschiedlichen Reaktionslösungen und Bewerten des farblich-codierten zeitabhängigen Intensitätsverlaufs (Kinetik) aller detektierten Komponenten in der Heatmap-Darstellung (Kapitel 6, **Publikation IV**). Für ermittelte Oxidationsnebenprodukte wurden strukturaufklärende Experimente (MS/MS-, H/D-Austausch- und Derivatisierungsexperimente) durchgeführt. Bei der Untersuchung konnten 11 Oxidationsnebenprodukte von 4- und 5-Methyl-1H-benzotriazol identifiziert werden. Danach wurden die Ergebnisse aus den Laborexperimenten auf den großtechnischen Prozess übertragen. Die dort vorliegenden geringen Konzentrationen der Ausgangssubstanzen erforderten den Einsatz der HPLC-MS/MS mit vorgeschalteter Festphasenextraktion. Nach der Optimierung der Analysenmethode mittels

Reaktionslösungen konnten drei Oxidationsnebenprodukte in Wasserproben des Ablaufs der Ozonung nachgewiesen werden.

Die Promotionsarbeit zeigt innovative Strategien für ein effektives und schnelles Screening und Identifizieren von nicht erwarteten und unbekanntem Substanzen. Die beschriebenen Vorgehensweisen sind nicht auf die Überwachung der Trinkwassergewinnung und -aufbereitung begrenzt, sondern lassen sich auf die unterschiedlichsten analytischen Fragestellungen übertragen. Die Arbeit trägt dazu bei, dass künftig bei Untersuchungsprogrammen der Umweltüberwachung das Non-Target-Screening als Ergänzung zu den routinemäßig durchgeführten Target-Screenings verstärkt eingesetzt wird.

II. Liste der Publikationen

Die dieser kumulativen Promotionsarbeit zugrunde liegenden Arbeiten wurden in nationalen und internationalen „Peer-Review“ Journals veröffentlicht.

I. Publikation

Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A New Approach to Data Evaluation in the Non-Target Screening of Organic Trace Substances in Water Analysis. *Chemosphere* 85, 1211-1219, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.009.

II. Publikation

Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, R., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 659-666, DOI:10.1002/rcm.4430.

III. Publikation

Müller, A., Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water. *Water Research*, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.033, accepted.

IV. Publikation

Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Schnelles Screening auf Ozonungsprodukte in Laborversuchen. *Vom Wasser* 108, 35-37.

V. Publikation (Anhang)

Weber, W.H., **Müller, A.**, Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2009. 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt - Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe. *Vom Wasser* 107, 16-24.

Abgedruckt mit der Erlaubnis von Chemosphere (Elsevier), Water Research (Elsevier), Rapid Communications in Mass Spectrometry (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA) und Vom Wasser (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA).

III. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbands Landeswasserversorgung in Kooperation mit dem Institut Umweltchemie der Leuphana Universität Lüneburg erstellt. Die Finanzierung erfolgte durch den Zweckverband Landeswasserversorgung (LW).

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, recht herzlich bedanken.

Herr Prof. Dr.-Ing. Wolfgang K. L. Ruck, ich danke Ihnen für meine Zulassung als Doktorand an der Leuphana Universität Lüneburg und die anschließende Betreuung meiner Arbeit. Neben den mir gewährten Freiheiten bei der Ausarbeitung möchte ich besonders Ihre stets Mut machende, aufbauende und freundliche Art hervorheben.

Für die Erstellung des zweiten Gutachtens danke ich Herrn Hon.-Prof. Dr. Ralf Ebinghaus.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Schulz für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit bei der LW. Ihre zahlreichen konstruktiven Anregungen und die mit mir geführten fachlichen Diskussionen waren immer hilfreich und hatten maßgeblichen Einfluss auf die vorliegende Arbeit. Die vielen Tagungen und Arbeitskreissitzungen, auf die ich Sie begleiten durfte, ermöglichten mir den Blick über den Tellerrand meines Beschäftigungsfelds bei der LW. Der damit verbundene Erfahrungsaustausch mit Fachkollegen brachte mir viele neue Ideen und Anstöße.

Großer Dank gilt auch Herrn Dr. Walter H. Weber. Walter, du hast nicht nur die Rahmenbedingungen für meine Arbeit bei der LW geschaffen, sondern dein aktives Einbringen bei meinen Projekten, deine Hilfestellungen und aufgezeigten Lösungswege halfen mir, mich ständig zu verbessern.

Bei Stefan Weiß, Nicole Jung und Dr. Wolfram Seitz möchte ich mich recht herzlich für die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft während meiner Zeit bei der LW bedanken. Eure Ratschläge, Kritiken, Korrekturen sowie eure stete Unterstützung bei Projekten haben mir sehr weitergeholfen.

Frau Sabine Junginger danke ich für die Hilfe im Labor. Sabine, du hattest immer eine praktikable und unbürokratische Lösung zur Hand. Mein Dank gilt auch Sarah Künzel für das Aufarbeiten von Tausenden Proben allein für mein Non-Target-Screening. Natürlich will ich mich auch noch bei allen nicht namentlich erwähnten Kolleginnen und Kollegen für ihre Unterstützung und die freundliche und herzliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Ein großes Dankeschön auch an Sie, Herr Prof. Dr. Dirk Flottmann. Sie haben bei der Betreuung meiner Diplomarbeit den Stein für diese Arbeit ins Rollen gebracht und am Laufen gehalten. Ich bin Ihnen dankbar für ihre bis heute mit Rat und Tat andauernde Unterstützung.

Des Weiteren will ich mich an dieser Stelle bei all den Praktikanten und Absolventen der Hochschule Aalen, die mir an der HPLC-QTOF-MS halfen, bedanken. Hierzu gehörten Angelina Taichrib, Felix Kohl, Stefan Saur, Christopher Rafai, Joachim Hof, Sebastian Schmiedt und Christine Grözinger. Besonders erwähnen will ich Judith Beißwenger und Hans Georg Leukhardt.

Großer Dank gilt auch meinen Freunden Johannes Schmidberger, Daniel Schmitt, Jürgen Zaune, Steffen Schnabel, Sven Bauer und meinem Onkel Erwin Bürk.

Meinem Bruder Michael danke ich für sein Engagement bei der Programmierung der Online-Datenbank DAIOS. Ohne deinen Einsatz wäre die Umsetzung des Konzepts zur Online-Datenbank kaum möglich gewesen.

Mein ganz besonderer und größter Dank gilt meinen Eltern Rose und Anton, die mich immer unterstützt haben.

Vielen Dank euch allen!

IV.	Inhaltsverzeichnis	
I.	Kurzfassung	IV
II.	Liste der Publikationen	VII
III.	Danksagung	VIII
IV.	Inhaltsverzeichnis	X
V.	Abkürzungsverzeichnis	XII
1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund der Arbeit	1
1.2	Der Zweckverband Landeswasserversorgung	6
1.3	Zielsetzung.....	6
2	Grundlagen	8
2.1	Festphasen-Extraktion	8
2.2	Ozonung bei der Trinkwasseraufbereitung.....	10
2.2.1	<i>Eigenschaften von Ozon</i>	10
2.2.2	<i>Ozon in der Trinkwasseraufbereitung</i>	12
2.2.3	<i>Reaktionen von Ozon mit Wasserinhaltsstoffen</i>	13
2.2.4	<i>Ozonungsversuche im Labormaßstab</i>	15
2.2.5	<i>Ozonanalytik</i>	15
2.3	Chromatographie	16
2.3.1	<i>Trennmechanismen der Chromatographie</i>	16
2.3.2	<i>Chromatographische Kenngrößen</i>	17
2.3.3	<i>Hochleistungsflüssigkeitschromatographie</i>	20
2.3.4	<i>Hochleistungsdünnschichtchromatographie</i>	25
2.4	Massenspektrometrie	29
2.4.1	<i>Elektrospray-Ionisation</i>	30
2.4.2	<i>Wichtige Begriffe der Massenspektrometrie</i>	32
2.4.3	<i>Linearer Quadrupol-Massenspektrometer</i>	37
2.4.4	<i>Flugzeit-Massenspektrometer</i>	39
2.4.5	<i>Detektion</i>	43
2.4.6	<i>Tandem-Massenspektrometer</i>	45
3	Publikation I	48
4	Publikation II	68
5	Publikation III	84
6	Publikation IV	107
7	Zusammenfassung und Ausblick	113

8	Literaturverzeichnis (Einleitung & Grundlagen)	119
9	Tabellenverzeichnis	129
9.1	Einleitung.....	129
9.2	Publikation I.....	129
9.3	Publikation II	129
9.4	Publikation III.....	129
10	Abbildungsverzeichnis	130
10.1	Einleitung.....	130
10.2	Publikation I.....	131
10.3	Publikation II	131
10.4	Publikation III.....	131
10.5	Publikation IV.....	131
11	Anhang	132
11.1	Zusammenfassung und Ausblick.....	132
11.2	Publikation V	134
11.3	Supplementary Information	152
	<i>11.3.1 Publikation I</i>	<i>152</i>
	<i>11.3.2 Publikation II</i>	<i>167</i>
	<i>11.3.3 Publikation III</i>	<i>173</i>
11.4	Publikationsverzeichnis	192
11.5	Lebenslauf.....	199

V. Abkürzungsverzeichnis

AMD	Automatisierte Mehrfachentwicklung Automated multiple development
APCI	Chemische Ionisation bei Atmosphärendruck Atmospheric pressure chemical ionisation
APPI	Photoionisation bei Atmosphärendruck Atmospheric pressure photo ionisation
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung Federal Ministry of Education and Research
CAS	Chemical Abstracts Service
cps	Impulse pro Sekunde Counts per second
CRM	Modell des geladenen Rückstandes Charge residue model
CXP	Austrittspotenzial der Kollisionszelle Collision cell exit potential
Da	Dalton (= u) Dalton (= u)
DAD	Diodenarray-Detektor Diode array detector
DAIOS	Datenbank-unterstützte Identifizierung von organischen Substanzen Database assisted identification of organic substances
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V. German Institute of Standardization
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff Dissolved organic carbon
DPD	N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamin N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamine
DPE	Verzögert gepulste Extraktion Delayed pulsed extraction
EIC	Extrahiertes Ionenstromchromatogramm Extracted ion current chromatogram
ESI	Elektrospray-Ionisation Electro-spray ionisation
eV	Elektronenvolt ($1,60219 \cdot 10^{-19}$ J) Electron volt ($1,60219 \cdot 10^{-19}$ J)
FWHM	Peakhalbwertsbreite Full width at half maximum
GC	Gaschromatographie Gas chromatography
Gl.	Gleichung Equation
H/D-Austausch H/D exchange	Wasserstoff-Deuterium-Austausch Hydrogen-deuterium exchange

HETP	Höhenäquivalent eines theoretischen Bodens Height equivalent to a theoretical plate
HPLC bzw. LC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie High performance liquid chromatography
HPLC-MS/MS bzw. QQQ-MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Triple quadrupole mass spectrometer
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatographie High performance thin-layer chromatography
IEM	Ionenemissionsmodell Ion emission model
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
K _{ow}	Oktanol/Wasser-Koeffizient Octanol/water partition coefficient
LLE	Flüssig-Flüssig-Extraktion Liquid liquid extraction
LOD	Nachweisgrenze Limit of detection
LOQ	Bestimmungsgrenze Limit of quantification
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis Mass-to-charge ratio
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration Occupational exposure limit
MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/-ionisation Matrix-assisted laser desorption/ionization
MCP	Mikrokanalplatte micro-channel plate
MDa	Mega-Dalton (=10 ⁶ u) Megadalton (=10 ⁶ u)
MeOH	Methanol Methanol
MFE	Molecular Feature Extractor (Software Agilent Technologies)
MFG	Molecular Formula Generator (Software Agilent Technologies)
MPP	Mass Profiler Professional (Software Agilent Technologies)
MRM	Spezieller MS/MS-Messmodus Multiple reaction monitoring
MS	Massenspektrometrie oder Massenspektrometer Mass spectrometry or mass spectrometer
MWL	Mehrwellenlängenscan Multiple wavelength scan
NOM	Natürliches organisches Material Natural organic matter

NP	Normalphase Normal-phase
PCA	Hauptkomponenten Analyse Principal component analysis
PFCs	Perfluorierte Verbindungen Perfluorinated compounds
ppm	Teile von einer Million Parts per million
Q	Quadrupol-Massenspektrometer Quadrupole mass spectrometer
QQQ-MS bzw. HPLC-MS/MS	Triple-Quadrupol-Massenspektrometer Triple quadrupole mass spectrometer
QTOF-MS	Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer Quadrupole-time-of-flight mass spectrometer
R	Auflösungsvermögen Resolving power
R _f	Retentionsfaktor Retention factor
RF	Hochfrequenz Radio frequency
RP	Umkehrphase Reversed-phase
RT	Retentionszeit Retention time
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis Signal-to-noise ratio
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher Secondary electron multiplier (SEM)
SPE	Festphasen-Extraktion Solid phase extraction
TIC	Totalionenstromchromatogramm Total ion current chromatogram
TLC	Dünnschichtchromatographie Thin-layer chromatography
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff Total organic carbon
TOF-MS	Flugzeit-Massenspektrometer Time-of-flight mass spectrometer
TP	Transformationsprodukt Transformation product
TrinkwV	Trinkwasserverordnung Drinking Water Ordinance
TWA	Trinkwasseraufbereitung Drinking water treatment
u	Atomare Masseneinheit (1 u=1.660 5402*10 ⁻²⁷ kg) Unified atomic mass unit (1 u=1.660 5402*10 ⁻²⁷ kg)
UV/VIS	Wellenlängenbereich des ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Lichts Wavelength range of the ultraviolet (UV) and visible (VIS) light

1 Einleitung

1.1 Hintergrund der Arbeit

Sauberes Trinkwasser ist das wichtigste Grundnahrungsmittel der Welt. In Deutschland kommt zu dessen Gewinnung neben Quell- und Grundwasser auch Oberflächenwasser nach Uferfiltration und sogar Oberflächenwasser direkt aus der fließenden Welle zum Einsatz. Die Qualität des Trinkwassers hängt stark von der Art, Herkunft und vorhandener Mikrobiologie sowie von der Belastung des Wassers mit anorganischen und organischen Substanzen ab. Die Beeinflussung der Wasserressourcen durch anthropogene Stoffe nahm seit der Industrialisierung in Folge der Produktionssteigerung und des Bevölkerungsanstiegs deutlich zu. Oberflächengewässer sind davon stärker betroffen als das Grundwasser, da viele der Substanzen im Erdreich adsorbiert oder durch mikrobiologische Prozesse abgebaut werden, bevor sie im Grundwasser ankommen.

Die Substanzen werden je nach Verwendung direkt oder indirekt über die Kläranlage (vgl. Abbildung 1-1; Farré et al., 2008) in die Umwelt eingetragen. Verwendete Haushalts- und Industriechemikalien sowie Arzneimittel und deren Metaboliten gelangen über das Abwassersystem in die Kläranlagen. Dort werden sie durch die physikalischen, biologischen und chemischen Aufarbeitungsschritte großteils entfernt. Um eine weitergehende Elimination anthropogener Stoffe zu erreichen, wird der Einsatz der Aktivkohlefiltration (Metzger, 2010) sowie der Ozonung (Ruck, 1992, Suarez et al., 2007, Huber et al., 2005) erprobt. Das geklärte Abwasser wird über den Vorfluter in die aquatische Umwelt eingeleitet. Der direkte Eintrag von anthropogenen Substanzen erfolgt zum einen durch gezieltes Ausbringen von Pflanzenschutzmitteln (Hogendoorn et al., 1996), Kunstdünger und Gülle, letztere enthält Tierarzneimittel und deren Metaboliten, und zum anderen durch Deponiesickerwasser (Holm et al., 1995) oder durch das unkontrollierte Austreten von Substanzen bei Unfällen (Farré et al., 2008). Deshalb werden die Rohwässer in Abhängigkeit ihrer Beschaffenheit im Wasserwerk mit unterschiedlichen Aufbereitungstechniken (z. B. Ozonung) behandelt, bevor diese als Trinkwasser an den Endverbraucher abgegeben werden.

In der Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001 (TrinkwV, 2001) sind Grenzwerte bestimmter Einzelsubstanzen (z. B. von Pflanzenschutzmitteln), Summenparameter (z. B. von adsorbierbaren organischen Halogenverbindungen), biologische Parameter (beispielsweise Koloniezahl) sowie weitere Qualitätskriterien (z. B. Trübung) geregelt. Bei nicht in der Verordnung aufgeführten Substanzen haben die Wasserversorger für möglichst geringe Belastungen zu sorgen. Die TrinkwV 2001 wurde nach ihrer Revision im Herbst 2011 durch die TrinkwV 2011 ersetzt (Borchers, 2011).

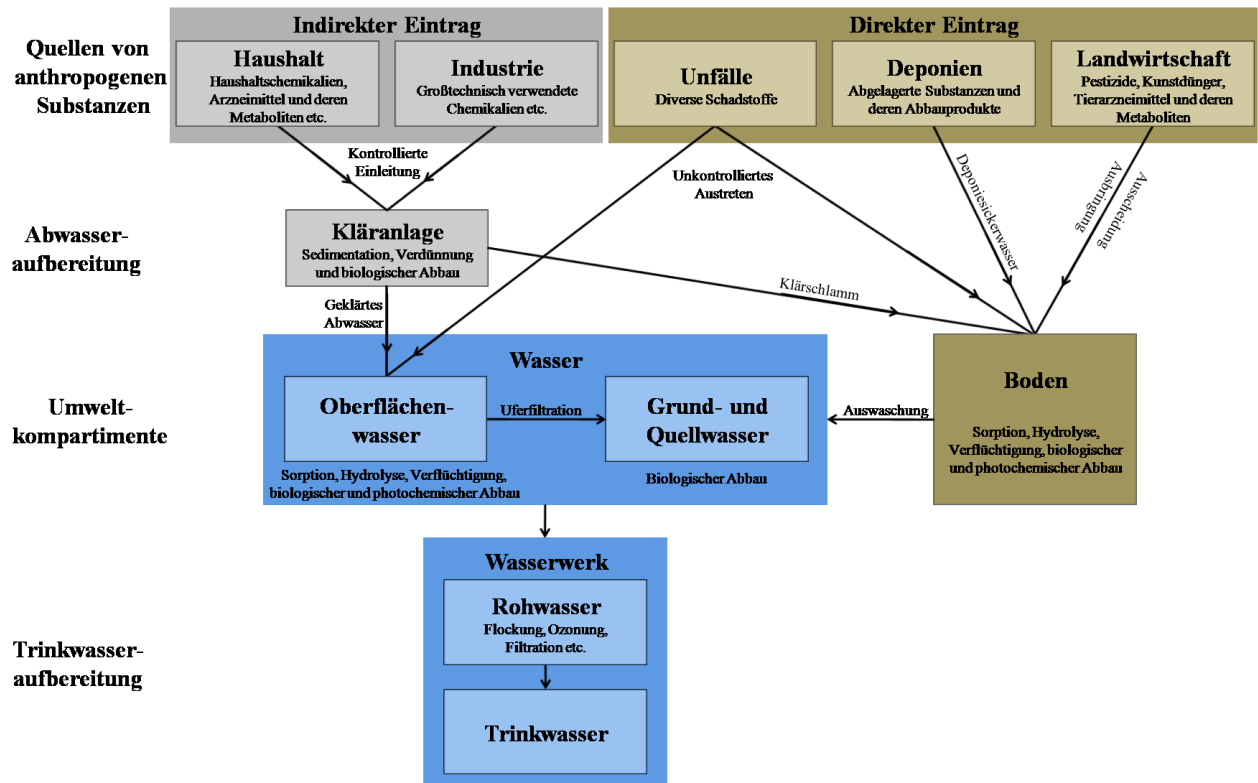


Abbildung 1-1: Quellen und Eintragspfade von anthropogenen Substanzen (verändert nach Farré et al., 2008)

Zur Sicherung der Trinkwasserqualität ist eine umfassende Überwachung der Roh- und Prozesswässer der Trinkwasseraufbereitung notwendig. Neue Anreicherungs- und Analysetechniken und deren ständige Weiterentwicklung ermöglichten in den letzten Jahrzehnten den Nachweis von immer weiteren anthropogenen Substanzen und Substanzgruppen in Wasserproben. Schon Ende der 1970er Jahre konnte das Vorkommen von Spurenverunreinigungen, wie chlorierten Pflanzenschutzmitteln, Mineralölkohlenwasserstoffen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, in der aquatischen Umwelt nachgewiesen werden. Die früher häufig verwendete Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde im Laufe der Zeit zunehmend durch die Festphasen-Extraktion ersetzt. Die Kombination der Anreicherungsverfahren mit der Kopplung der Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) ermöglicht sehr niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen. Deshalb ist die GC-MS eine der bevorzugt eingesetzten Analysemethoden für die Bestimmung von organischen Spurenstoffen (Barceló und Petrovic, 2007). Mit dieser Analysetechnik lassen sich neben unpolaren Substanzen mit Hilfe von Derivatisierungsreagenzien auch polarere Substanzen bestimmen (Kosjek et al., 2007). Der Vorgang der Derivatisierung ist jedoch meist aufwendig und zeitintensiv (Hernando et al., 2004).

Daher wird heute für den Nachweis von polaren Verbindungen oftmals die Kopplung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit einem Massenspektrometer (MS) eingesetzt. Vor allem Tandem-Massenspektrometer, wie Triple-Quadrupol-MS (QQQ-MS), zeichnen sich

durch eine sehr hohe Empfindlichkeit und Selektivität aus (Barceló und Petrovic, 2007). Dadurch können organische Spurenstoffe ohne vorherige Anreicherung im unteren ng L⁻¹-Bereich bestimmt werden (Reemtsma, 2003, Seitz et al., 2006).

Für eine umfassende Überwachung der bei der Trinkwasseraufbereitung verwendeten Wasserressourcen ist neben dem Screening auf bekannte Spurenstoffe (Target-Screening), z. B. die in der TrinkwV 2001 regulierten Substanzen, auch ein Screening auf nicht erwartete bzw. unbekannte Substanzen sinnvoll (Non-Target-Screening). Für die verschiedenen Arten von Screenings sind in der Fachliteratur viele unterschiedliche Begriffe zu finden. Eine Auswahl ist in Tabelle 1-1 aufgelistet. Zum Teil können die Begriffe synonym genutzt werden (z. B. Non-Target-Screening und General-Unknown-Screening). Jedoch erfolgt die Verwendung der Begriffe nicht immer in einem einheitlichen Zusammenhang. In der vorliegenden Arbeit wird die prinzipielle Unterteilung der Vorgehensweisen in Pre-, Post- und Non-Target-Screening nach Hernández et al. (2005) verwendet.

Tabelle 1-1: Auswahl an Begriffen für die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei einem Screening

Target analysis (Hogenboom et al., 1998)	Target analysis screening (Hopfgartner et al., 2004)	Pre-target screening (Hernández et al., 2005)
Post-target screening (Hernández et al., 2005)	Targeted analysis (Cordewener, 2009)	Multi-target screening (Mueller et al., 2005)
„Determination of known and unknown“ (Martínez Vidal et al., 2009)	“Known unknown“ (Barceló and Petrovic, 2007)	“Unknown unknown“ (Barceló and Petrovic, 2007)
Unknown analysis (García Reyes et al., 2007)	Untargeted method (Cordewener, 2009)	Unknown identification (Soler and Picó, 2007)
“General-unknown” analysis (Maurer and Pflieger, 1988)	Non-target screening (Hernández et al., 2005)	General unknown screening (Koepfel and Tenzler, 1995)
“Non-target unknown” screening (Ibáñez et al., 2008)	Non-target analysis (Bulterman, 1993)	Nontargeted identification method (Cordewener, 2009)

Für das Pre-, Post- und Non-Target-Screening mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS) wurden aus in der Literatur beschriebenen und bisher angewendeten Screeningmethoden die in Abbildung 1-2 dargestellten verallgemeinerten Vorgehensweisen herausgearbeitet (z. B., Hogenboom et al., 1998; Bobeldijk et al., 2001; Saint-Marcoux et al., 2003; Reemtsma, 2003; Ibáñez et al., 2004; Eichhorn et al., 2005; Hernández et al., 2005; Mueller et al., 2005; Thurman et al., 2005; Ibáñez et al., 2006; Petrovic and Barceló, 2006; Garcia-Reyes et al., 2007; Kosjek et al., 2007; Soler and Picó, 2007; Ibáñez et al., 2008; Werner et al., 2008; Hogenboom et al., 2009; Martínez Vidal et al., 2009; Tolonen et al., 2009).

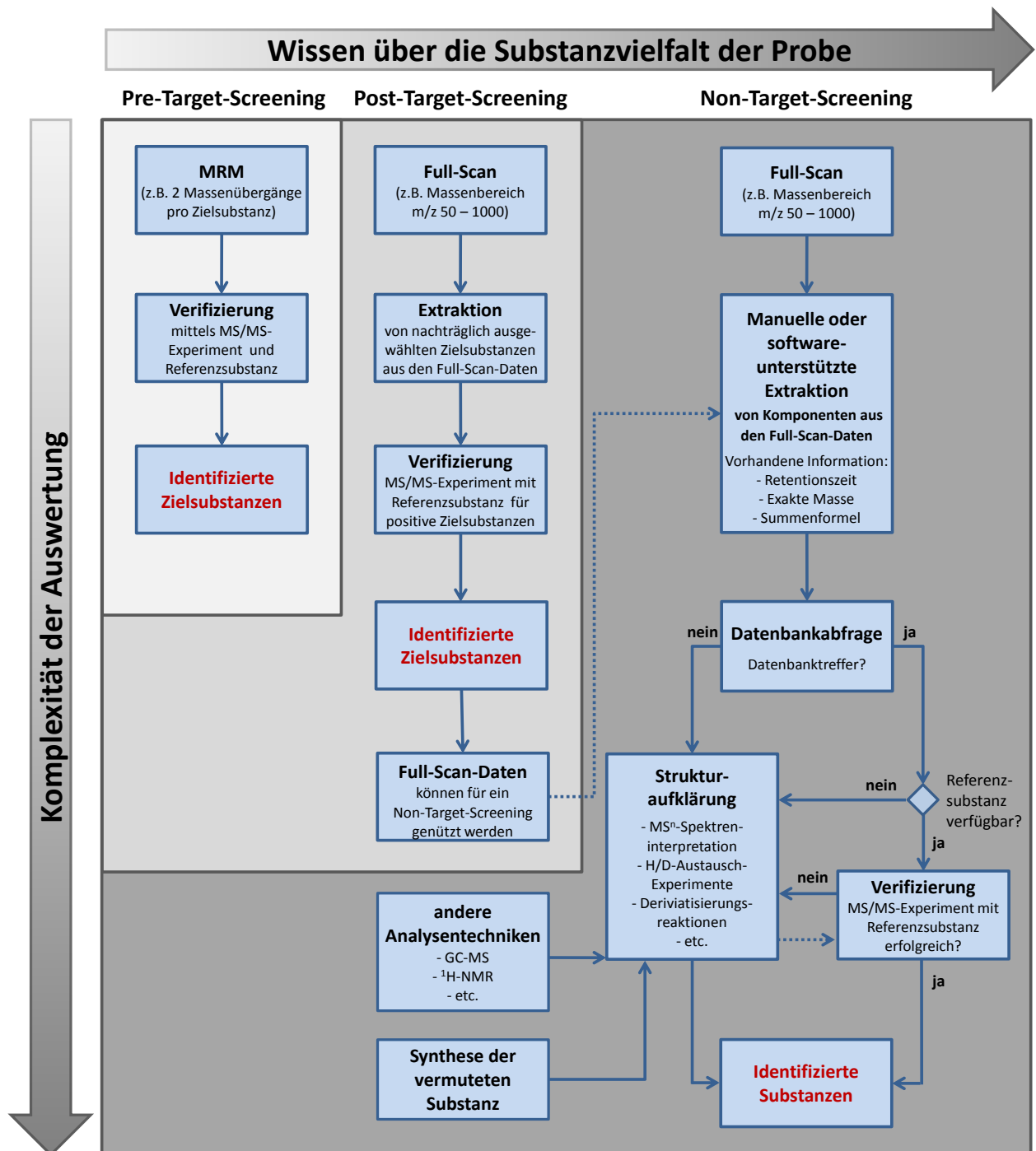


Abbildung 1-2: Vorgehensweisen für das Pre-, Post- und Non-Target-Screening mittels HPLC-MS

Beim Pre-Target-Screening sind die zu bestimmenden Analyten vor der Analyse bereits festgelegt. Weitere in der Probe befindliche Kontaminanten werden hierbei nicht detektiert. Für die Detektion der organischen Spurenstoffe werden überwiegend Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im Multiple-Reaktion-Monitoring-Modus (MRM) aufgrund ihrer Selektivität und ihres hohen Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N, engl. signal-to-noise ratio) eingesetzt. Zur Verifizierung und Quantifizierung von Positiv-Befunden werden Referenzsubstanzen herangezogen.

Die Durchführung eines Post-Target-Screenings erfolgt hingegen im Full-Scan-Modus. Hierbei werden im Gegensatz zum MRM-Messmodus alle Verbindungen, die von der Chromatographie-säule eluieren und in der Ionenquelle ionisieren, durch das Massenspektrometer detektiert. Als Massenanalytoren finden vor allem Flugzeit- oder Fourier-Transformations-Massenspektrometer wegen ihrer hohen Empfindlichkeit bei gleichzeitiger hoher Auflösung und Massengenauigkeit im Scan-Modus Verwendung. Aus den erzeugten Full-Scan-Datensätzen können nach der Messung ausgewählte Zielsubstanzen anhand des peakförmigen Verlaufs ihrer extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) bei entsprechender Retentionszeit erkannt werden. Nur für vorhandene Substanzen (Positiv-Befunde) wird anschließend eine Verifizierung und Quantifizierung mittels Referenzsubstanz und MS/MS-Experiment durchgeführt. Aufgrund von mess- und softwaretechnischen Weiterentwicklungen wird heutzutage zunehmend die Erkennung und Verifizierung von Zielsubstanzen, anders als in Abbildung 1-2 dargestellt, in einem Arbeitsschritt durchgeführt. Hierbei werden beim Überschreiten des Precursorsignals einer Substanz zusätzlich MS/MS-Spektren erzeugt, welche mit den Einträgen einer Spektrenbibliothek abgeglichen werden können. Dadurch ist eine simultane Überprüfung von mehreren Hundert bekannten Umweltkontaminanten mit relativ geringem Aufwand möglich.

Die Full-Scan-Datensätze des Post-Target-Screenings lassen sich außerdem zu einem Non-Target-Screening verwenden, da bei den beiden Screeningansätzen die gleiche Analysentechnik und der gleiche Messmodus angewendet werden. Jedoch findet beim Non-Target-Screening keine Fokussierung auf Pre- oder Post-Target-Analyten statt. Hierbei sollen auch nicht erwartete bzw. unbekannte Substanzen in den Proben erfasst werden. Dazu ist es erforderlich, den Full-Scan-Datensatz nach Massen, deren Intensität einem chromatographischen Peakprofil folgt, zu durchsuchen. Über den Peakverlauf bildet sich auf der Massenachse das Isotopenmuster der Verbindung ab (Massenspektrum). Die Extraktion der Probenkomponenten wird üblicherweise mit geeigneten Softwarealgorithmen durchgeführt. Sind substanzspezifische Daten, wie beispielsweise Masse, Retentionszeit oder Summenformel (Elementzusammensetzung), einer Komponente bekannt, erfolgt nach einer Datenbankabfrage die Identifizierung entweder mittels Referenzsubstanz und MS/MS-Experimenten oder über strukturaufklärende Experimente (z. B. H/D-Austausch-Experimente).

Die in Abbildung 1-2 dargestellten Vorgehensweisen für ein Screening unterscheiden sich bei der Durchführung in Art und Anzahl der benötigten Arbeitsschritte. Daraus ergibt sich je nach Screening ein entsprechendes Wissen über die Substanzvielfalt in den analysierten Proben. Nach einem Pre-Target-Screening sind die Konzentrationen von wenigen Target-Analyten bekannt. Hingegen werden beim Non-Target-Screening alle Substanzen, die mit der verwendeten Analysentechnik analysierbar sind, erkannt. Die Anzahl der hierbei identifizierten Substanzen hängt stark von probenspezifischen Parametern (z. B. den Intensitäten der Komponenten oder vorhandenen Matrixeffekten), den eingesetzten Analysentechniken sowie von dem erbrachten

Zeit- und Arbeitsaufwand für die Identifizierung ab. Je umfassender das Wissen über die Substanzvielfalt einer Probe sein soll, desto aufwendiger und komplexer werden der Analysenablauf und die damit verbundene Datenauswertung. Im Allgemeinen wird durch die einer Untersuchung zugrunde liegende Fragestellung (z. B. Konzentrationsbestimmung von Pflanzenschutzmitteln oder Identifizierung unbekannter Transformationsprodukte) vorgegeben, welche der drei Screeningmethoden eingesetzt wird.

1.2 Der Zweckverband Landeswasserversorgung

Der Fernwasserversorger Zweckverband Landeswasserversorgung wurde 1912 gegründet, um die Trinkwasserversorgung der Bevölkerung von Stuttgart und von großen Teilen der Schwäbischen Alb zu sichern. In dem Versorgungsgebiet leben heute über drei Millionen Einwohner. Der Zweckverband Landeswasserversorgung betreibt zwei Wasserwerke und ein ca. 790 km langes Fernwasserleitungsnetz. Im Wasserwerk bei Dischingen wird Quellwasser eines Karstbruchs zur Trinkwasseraufbereitung verwendet. Das Wasserwerk bei Langenau gewinnt das Rohwasser aus dem Grundwasser des Donaurieds und dem Oberflächenwasser der Donau. Das Einzugsgebiet des Donaurieds beträgt ca. 520 km² und besteht überwiegend aus landwirtschaftlichen Nutzflächen (ca. 50 %) und Waldgebieten. Die Entnahme des Donauwassers erfolgt flussabwärts der Städte Ulm und Neu-Ulm direkt aus der fließenden Welle. Über einen mehrstufigen Reinigungsprozess (siehe Abbildung 2-3) wird es im Wasserwerk zu Trinkwasser aufbereitet. Das Betriebs- und Forschungslaboratorium stellt durch laufende Untersuchungen die Einhaltung der hohen Anforderungen der TrinkwV 2011 sicher.

1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war, Strategien und Methoden zu entwickeln, die ein schnelles Screening und eine Identifizierung von unerwarteten und unbekanntem Substanzen in Wasserproben ermöglichen. Dadurch soll ein rechtzeitiges Erkennen von neuartigen Kontaminanten der Roh- und Prozesswässer sowie des Trinkwassers gewährleistet werden. Die Grundlage für das Konzept des Non-Target-Screenings bildeten bereits in der Literatur beschriebene Vorgehensweisen. Diese wurden abhängig vom ursprünglichen Anwendungsgebiet (z. B. Proteomics oder Lebensmittelchemie) übernommen und an die Anforderungen des Non-Target-Screenings von „kleinen Molekülen“ in der aquatischen Umwelt angepasst. Hauptsächlich wurden jedoch selbst entwickelte Konzepte berücksichtigt. Im Betriebs- und Forschungslaboratorium des Fernwasserversorgers Zweckverband Landeswasserversorgung erfolgte insbesondere eine Fokussierung auf Screening-Fragestellungen der Trinkwassergewinnung und -aufbereitung. Hierzu gehörte neben der Überwachung der Rohwasserressourcen auf eine Beeinflussung durch mögliche Kontaminationsquellen (z. B. Kläranlagenausläufe oder Altlasten) auch das Erkennen von

Veränderungen (z. B. Bildung von Transformationsprodukten) in den Prozesswässern durch die eingesetzten Aufbereitungstechniken (z. B. Ozonung). Jedoch sollten die entwickelten Methoden generell auch auf die unterschiedlichen Fragestellungen der Umweltanalytik übertragbar sein. Für das Non-Target-Screening wurde als zentrales Analysensystem ein HPLC-QTOF-MS mit Elektrospray-Ionisation (ESI) ausgewählt, da mit dieser Analysetechnik ein Großteil des in der aquatischen Umwelt vorkommenden Substanzspektrums detektierbar ist. Weitere im Labor vorhandene Analysensysteme (z. B. HPTLC/AMD) wurden unterstützend bei dem Non-Target-Screening, z. B. zur Strukturaufklärung von unbekanntem Substanzen, eingesetzt.

Die zentralen Punkte dieser Arbeit sind:

1. Entwicklung von Strategien für ein Non-Target-Screening zur Überwachung von organischen Spurenstoffen in Wasser
2. Berücksichtigung aller detektierter Probenkomponenten bei der Datenauswertung
3. Konzeption einer Online-Datenbank, die speziell an die Anforderungen des Non-Target-Screenings angepasst ist
4. Erstellung eines Konzeptes für ein schnelles Screening auf Ozonungsnebenprodukte identifizierter Wasserkontaminanten in Laborversuchen und ihr anschließender Nachweis in der Trinkwasseraufbereitung
5. Aufzeigen der Möglichkeiten und Grenzen des Non-Target-Screenings an Beispielen der Trinkwassergewinnung und -aufbereitung.

2 Grundlagen

2.1 Festphasen-Extraktion

In der Umweltanalytik sind die Konzentrationen der Analyten oftmals sehr gering, sodass eine direkte Analyse selbst mit hochmodernen Messgeräten, wie beispielsweise einem HPLC-MS/MS-System, nicht immer möglich ist. Deshalb werden häufig die Proben mittels der Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE, engl. liquid liquid extraction) und Festphasen-Extraktion (SPE, engl. solid phase extraction) angereichert. Bei der klassisch verwendeten LLE werden die Analyten aus der wässrigen Phase in der mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase aufkonzentriert. Hierbei ist das Verteilungsgleichgewicht der Analyten in den beiden Phasen maßgeblich. Nachteile der LLE sind die Verwendung von relativ sperrigen Glasapparaturen, der große Lösungsmittelverbrauch und die daraus resultierenden Kosten. Außerdem können sich Emulsionen mit der wässrigen Probe bilden und die Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte ist schwierig (Thurman und Mills, 1998). Des Weiteren werden wasserunlösliche Lösemittel benötigt, wie z. B. Chloroform oder Dichlormethan, die umwelt- und gesundheitsschädlich sind. Die LLE war jahrelang die bevorzugte Technik für die Aufarbeitung von flüssigen Proben, besonders im Umweltbereich (Hennion, 1999). Sie wurde jedoch in den letzten beiden Jahrzehnten von der SPE zunehmend verdrängt.

Die wissenschaftliche Entwicklung der SPE wurde erst ab den 1970er Jahren vorangetrieben. Vorgepackte Einwegkartuschen mit gebundenen Kieselgel-Phasen waren nicht vor 1977 verfügbar. Entsprechende wissenschaftliche Artikel (z. B. Subden et al., 1978) über die SPE sind erst für die folgenden Jahre zu finden (Simpson, 2000). In der Umweltanalytik wurde die SPE schon in den 1980er Jahren unter anderem zur Anreicherung von verschiedenen Pestiziden bei der Überwachung von Grund- und Trinkwässern benutzt (Weber, 1988). Die SPE besitzt folgende Vorteile gegenüber der LLE: geringerer Verbrauch an Lösungsmitteln, deutliche Kostensenkung pro Probe, große Auswahl an Sorbentien und Zeitersparnis durch verbesserte Automatisierung (Thurman und Mills, 1998; Hennion, 1999). Bei der SPE handelt es sich um eine Art „Säulenchromatographie“. Durch die Wahl der Sorbentien, des pH-Werts und der Eluenten mit ihren polaren, unpolaren oder ionischen Wechselwirkungen kann die SPE für die zu untersuchenden Analyten optimiert werden.

Als stationäre Phase wird bei der SPE häufig Silicagel verwendet, weniger Aluminiumoxid oder Hydroxylapatit (Gey, 2008). An der Oberfläche von Silicagel befinden sich freie, polare Silanolgruppen, die mit den Analyten Wasserstoff-Brücken und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen ausbilden. Deshalb können bei der SPE unter Verwendung von sogenannten Normalphasen (NP, engl. Normal-phase) im Vergleich zur LLE relativ polare Stoffe angereichert werden. Gleiches

gilt für Silicagele, die mit polaren Gruppen, wie beispielsweise Cyano-, Amino- oder Diolgruppen, modifiziert wurden (Hennion, 1999). Erfolgt jedoch eine Modifizierung der Silanolgruppen des Silicagels mit nicht polaren Gruppen, wie beispielsweise C8- oder C18-Ketten, so treten vor allem Van-der-Waals-Kräfte zwischen den Alkylketten der stationären Phase und den Analyten auf. Hierbei werden überwiegend unpolare Substanzen auf der sogenannten Umkehrphase (RP, engl. Reversed-phase) adsorbiert. Durch die partielle Modifizierung mit Hydroxyl-, Amino- oder Cyanogruppen können auch Moleküle mit höherer Polarität auf diesen Phasen zurückgehalten werden. Dies gilt auch für Polymermaterialien, wie beispielsweise für das Styrendivinylbenzol-Copolymer, die als Alternative zu Silicagel entwickelt wurden. Bei diesen Phasen treten zusätzlich noch starke π - π -Wechselwirkungen zwischen den Aromaten des Polymers und den Analyten auf (Hennion, 1999). Außerdem können Polymerphasen in einem pH-Bereich von 1 - 13 eingesetzt werden, hingegen sind Phasen basierend auf Silicagel nur in einem pH-Bereich von 2 - 8 hydrolysestabil (Gey, 2008).

Für die Anreicherung von ionischen Analyten werden Ionenaustauscherharze als Sorbensmaterial verwendet. Poröser, graphitisierter Kohlenstoff als stationäre Phase besitzt sowohl unpolare als auch polare Wechselwirkungen und ist somit für die Extraktion eines breiten Spektrums an Analyten geeignet (Hennion, 1999; Seitz, 2007). In Tabelle 2-1 sind die Bindungsenergien der bei der SPE auftretenden Wechselwirkungen dargestellt.

Tabelle 2-1: Wechselwirkungen mit den dazugehörigen Bindungsenergien (Hennion, 1999)

Art der Wechselwirkung	Energie (kcal mol ⁻¹)*
Van-der-Waals-Kräfte	1 - 5
Dipol-induzierte-Dipolkräfte	2 - 7
Dipol-Dipol-Kräfte	5 - 10
Wasserstoff-Brücken-Bindungen	5 - 10
Ionische Bindungen	50 - 200
Kovalente Bindungen	100 - 1000

* 1 cal (Kalorie) = 4.184 J

Durchführung der SPE

Mit Hilfe der SPE kann neben der Anreicherung von Analyten auch die Entfernung von Matrix (Clean-up) und/oder ein Lösungsmittelwechsel erreicht werden (Simpson, 2000). Hierzu werden entweder die Analyten zurückgehalten und anschließend von der stationären Phase eluiert oder sie passieren die stationäre Phase und die Matrix wird retardiert. Allerdings führt die zweite Methode zu keiner Anreicherung der Analyten.

Die Abbildung 2-1 zeigt schematisch den Ablauf einer SPE. Zunächst wird die Festphase mittels unterschiedlicher Lösungsmittel von herstellungsbedingten Kontaminationen befreit und konditioniert (1.). Danach wird die Probe entweder durch die SPE-Kartusche gesaugt oder gedrückt, wobei die Analyten und zum Teil auch unerwünschte Begleitstoffe zurückgehalten werden (2.). Durch vorsichtiges Spülen mit geeigneten Lösungsmitteln wird der Großteil der angereicherten Matrix entfernt (3.). Zwischen den einzelnen Schritten darf das Sorbens nicht trocken laufen, da dies zur Bildung von Kanälen in der SPE-Phase führt. Dies hat neben einer verminderten Aufenthaltsdauer der Analyten meist auch eine Inaktivierung des Festphasenmaterials zur Folge. Nach der Probenextraktion wird die SPE-Kartusche im Stickstoff- bzw. Luftstrom getrocknet, um abschließend die Analyten mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Sorbens zu eluieren (4., Gey, 2008).

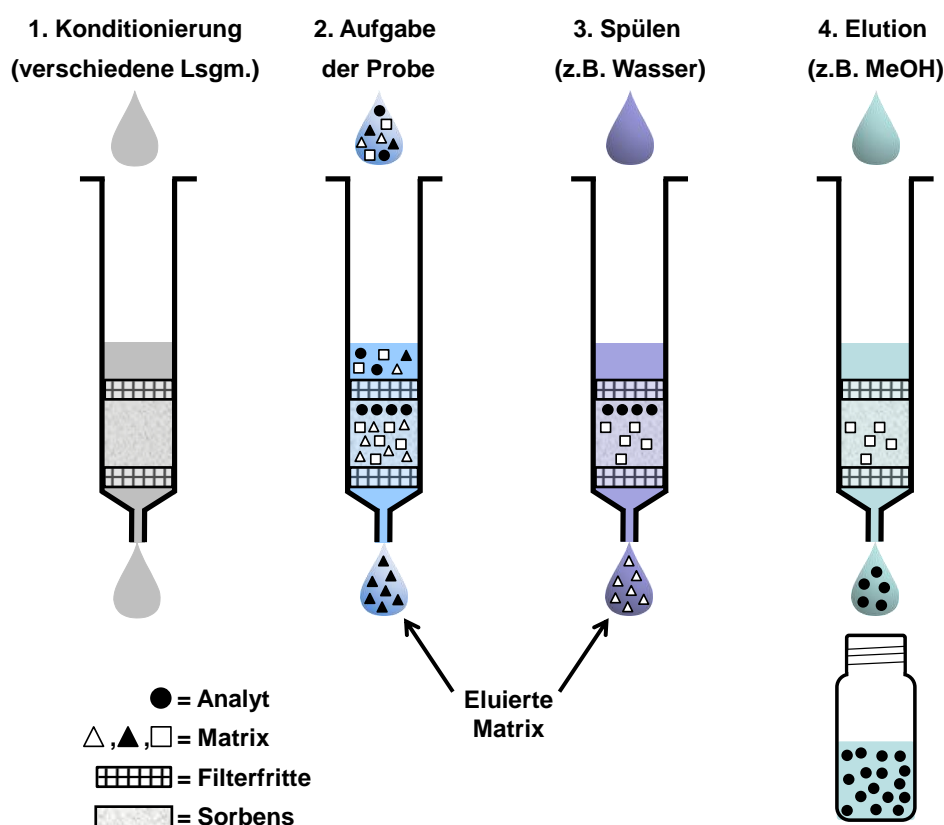


Abbildung 2-1: Durchführung der SPE (verändert nach Thurman und Mills, 1998)

2.2 Ozonung bei der Trinkwasseraufbereitung

2.2.1 Eigenschaften von Ozon

Ozon (O_3) stellt eine allotrope Form zum zweiatomigen Sauerstoffmolekül (O_2) dar, d. h. es tritt in verschiedenen Formen im gleichen Aggregatzustand auf. Es handelt sich hierbei um ein toxisches, bläuliches Gas mit einem charakteristischen Geruch. Die Geruchsschwelle liegt bei

0,03 mg m⁻³. Bereits bei einer Konzentration von 0,04 - 1 mg m⁻³ ist der Geruchssinn blockiert (MAK-Wert_{Luft} = 0,2 mg m⁻³; Frimmel et al., 1993). Die beim Einatmen auftretende Schädigung der Atemwege ist abhängig von der Konzentration und Einwirkungsdauer des Ozons. Der Schmelzpunkt von Ozon liegt bei -192,5 °C ($\rho = 1,73 \text{ g cm}^{-3}$) und der Siedepunkt wird bei -110,5 °C ($\rho = 1,46 \text{ g cm}^{-3}$) erreicht (Holleman und Wiberg, 1995). Ozon besitzt eine molare Masse von 48,0 g mol⁻¹ und der Bindungswinkel des gewinkelten Moleküls beträgt 117°. Die gleichlangen Bindungen von 128 pm können durch delokalisierte π -Bindungen erklärt werden. Das Ozonmolekül ist diamagnetisch und kann durch unterschiedliche mesomere Grenzstrukturen beschrieben werden (Abbildung 2-2).

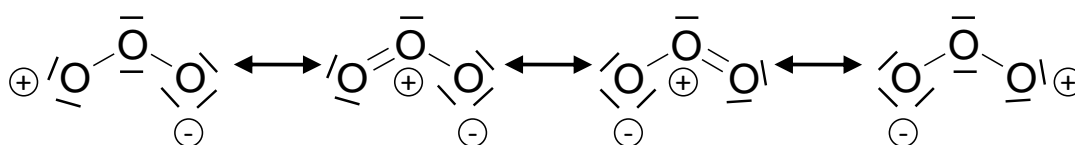


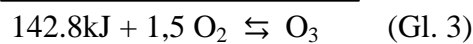
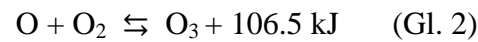
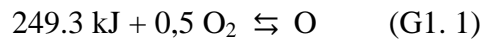
Abbildung 2-2: Mesomere Grenzstrukturen von Ozon (Hoigné, 1998)

In Tabelle 2-2 ist eine Auswahl an Oxidations- und Desinfektionsmitteln der Trinkwasseraufbereitung mit ihren Redoxpotenzialen unter Normalbedingungen aufgeführt. Ozon besitzt das höchste Redoxpotenzial aller für die Wasseraufbereitung zugelassenen Oxidationsmittel. Beim Einsatz von Ozon sollte beachtet werden, dass es sich gegenüber den meisten Werkstoffen sehr aggressiv verhält. Weitestgehend inert sind jedoch beispielsweise Edelstahl, Aluminium, Polytetrafluorethylen, Glas oder Keramik. Mit organischen Materialien, wie z. B. Gummi, kann gasförmiges Ozon explosionsartig reagieren (Frimmel et al., 1993).

Tabelle 2-2: Auswahl von Oxidations- und Desinfektionsmittel der Trinkwasseraufbereitung (Frimmel et al., 1993; Atkins, 2001)

Stoff	Verwendungszweck	Chem. Formel	Spezies	Redoxpotenzial E° [V] bei 25°C
Ozon	Oxidation und Desinfektion	O ₃	$\text{O}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$	2,07
Natriumperoxidsulfat	Oxidation	Na ₂ S ₂ O ₈	$\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-}$	2,05
Wasserstoffperoxid	Oxidation und Desinfektion	H ₂ O ₂	$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1,78
Hypochlorite	Desinfektion	OCl ⁻	$2\text{HClO} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1,63
Kaliumpermanganat	Oxidation	KMnO ₄	$\text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+ + 5\text{e}^- \rightarrow \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$	1,51
Chlordioxid	Desinfektion	ClO ₂	$\text{ClO}_2 + \text{e}^- \rightarrow \text{ClO}_2^-$	0,95
Chlor	Desinfektion	Cl ₂	$\text{Cl}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^-$	1,36
Sauerstoff	Oxidation	O ₂	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	1,23

Ozon bildet sich durch die Reaktion von Sauerstoffatomen mit Sauerstoffmolekülen (Gl. 2). Die Sauerstoffatome entstehen meist durch die Spaltung von Sauerstoffmolekülen (Gl. 1), die durch thermische, elektrische, photochemische oder chemische Energie verursacht wird. Die benötigte Gesamtenergie für die Erzeugung von Ozon beträgt 142.8 kJ (Gl. 3).



In der Natur entsteht Ozon hauptsächlich durch die Wechselwirkung von Sauerstoffmolekülen mit dem Sonnenlicht. Hier wird die Spaltung der Sauerstoffmoleküle durch das energiereiche UV-Licht ($\lambda < 242 \text{ nm}$) hervorgerufen. Durch langwelliges UV-Licht zersetzt sich Ozon. In der Atmosphäre stellt sich je nach Höhenlage ein photochemisches Gleichgewicht ein, wobei in einer Höhe von 20 - 25 km (Stratosphäre) eine maximale Konzentration an Ozon vorzufinden ist. Da Ozon UV-Licht absorbiert, wirkt diese Ozonschicht als Filter für die UV-Strahlung der Sonne (Mortimer, 2001).

Die technische Herstellung von Ozon erfolgt nach dem Prinzip des „Siemens’schen Ozonisators“. Hierbei wird Luft bzw. Sauerstoff durch zwei metallbeschichtete Glasröhren geleitet, an denen niederfrequente Spannung anliegt. Zwischen den Elektroden treten im Gasraum sogenannte „stille“ Entladungen auf, die zur Bildung von Ozon führen (Holleman und Wiberg, 1995). Bei mit Luft betriebenen Ozonisatoren werden Gasgemische mit 1 - 4 % Ozon erzeugt, bei Verwendung von Sauerstoff werden 6 - 16 % erreicht (Rakness, 2005).

2.2.2 Ozon in der Trinkwasseraufbereitung

Ozon ist ein starkes Oxidations- und Desinfektionsmittel und wird deshalb im Umweltbereich seit über 100 Jahren für die Aufarbeitung von Wasser eingesetzt. 1906 wurde Ozon bereits zur Desinfektion von Wasser in Nizza (Frankreich) genutzt. In Europa gab es 1960, im Gegensatz zu den USA, schon Tausende von Wasseraufbereitungsanlagen mit Ozonung. In den letzten zwei Jahrzehnten fand allerdings auch in den USA die Ozonung als Aufarbeitungsschritt verstärkt Verwendung (Rakness, 2005). Neben der Desinfektion hat die Behandlung von Wasser mit Ozon folgende Effekte (Hoigné, 1998):

- Oxidation von anorganischen und organischen Substanzen
- Entfernung von Farb- und Geruchsstoffen im Wasser
- verbesserte mikrobiologische Abbaubarkeit von gelösten organischen Wasserinhaltsstoffen bei anschließenden mikrobiologischen Prozessen
- u. U. höhere Effizienz bei Sedimentations-, Flockungfiltrations- und Flotationsverfahren

Übliche verwendete Ozondosiermengen sind 0,5 - 1,5 mg Ozon pro mg gelösten organischen Kohlenstoff (DOC, engl. dissolved organic carbon). Camel und Bermond (1998) beschreiben drei Möglichkeiten des Einsatzes von Ozon während der Trinkwasseraufbereitung (TWA). Wird die Ozonung als Vorstufe der TWA verwendet, so werden mineralische Komponenten, Färbung, Trübung, Geruch und suspendierte Farbstoffe entfernt. Teilweise wird natürliches organisches Material (NOM, engl. Natural organic matter) abgebaut, Mikroorganismen werden abgetötet und die Koagulations- und Flockungseigenschaften verbessert. Weiter ist die Anwendung von Ozon zwischen einzelnen Aufarbeitungsschritten möglich (vgl. Abbildung 2-3). Hierbei werden toxische Spurenstoffe und Vorläufersubstanzen (z. B. von Trihalomethan) oxidiert. Die biologische Abbaubarkeit von organischen Substanzen wird dadurch verbessert, was zu einer höheren Entfernungsrates und Mineralisierung der Oxidationsnebenprodukte bei anschließender Sand- und Aktivkohlefiltration führt. Die Ozonung kann aber auch am Ende der TWA zur Desinfektion des aufbereiteten Wassers verwendet werden.

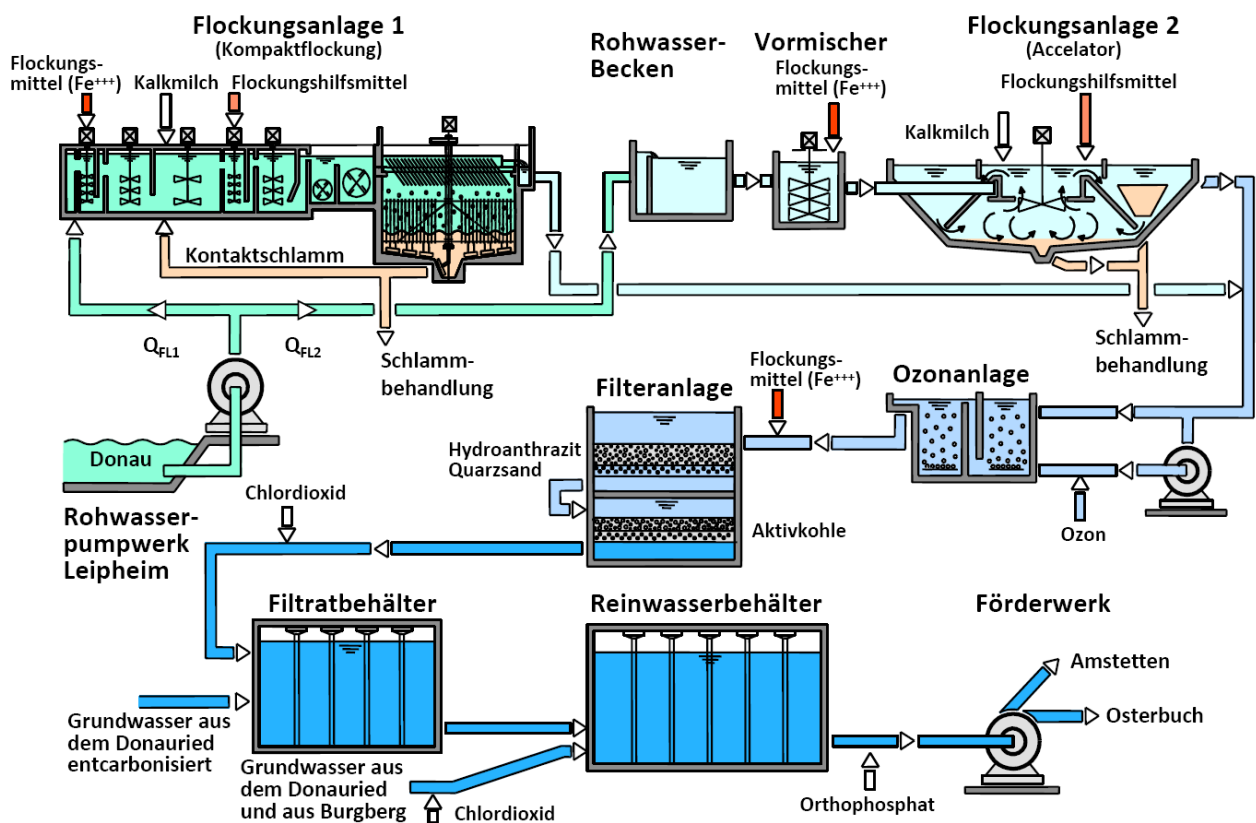


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Trinkwasseraufbereitung (Zweckverband Landeswasserversorgung, Stuttgart, Deutschland)

2.2.3 Reaktionen von Ozon mit Wasserinhaltsstoffen

Die Oxidation von Wasserinhaltsstoffen beruht bei der Ozonung auf zwei grundlegende Reaktionsmechanismen:

1. In sauren Wässern reagieren die Substanzen direkt mit dem molekularen Ozon. Der Angriff des Ozonmoleküls ist hierbei sehr selektiv.
2. Im basischen Medium zerfällt das Ozon unter Einfluss von OH^- -Ionen und es bilden sich OH-Radikale (Frimmel et al., 1993). Das Hydroxylradikal ist das stärkste Oxidationsmittel in Wasser (Staelin und Hoigné, 1985) und reagiert fast ausschließlich diffusionskontrolliert (von Gunten, 2003). Ihre Bildung kann durch Zugabe von Wasserstoffperoxid oder UV-Bestrahlung des ozonhaltigen Wassers gefördert werden.

Der dominierende Mechanismus bei der Ozonung hängt unter anderem stark von Temperatur, pH-Wert, Alkalinität und dem Anteil an gelöstem organischem Kohlenstoff des ozonierten Wassers ab. Die Verbindungen, die den DOC-Gehalt ausmachen, fungieren als Radikalfänger und konkurrieren so mit den eigentlich gewünschten Ozonierungsreaktionen.

Anorganische Wasserinhaltsstoffe werden bei der Reaktion mit Ozon in die jeweils höchste Oxidationsstufe überführt. Entsprechend ihrer Ausgangskonzentration werden sie stöchiometrisch umgesetzt. Aufgrund der leichten Oxidierbarkeit von Fe^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen wird durch die Ozonung eine Enteisung bzw. Entmanganung erreicht. Liegen diese Ionen als Komplexe vor, werden diese durch das Ozon zerstört. Weiter werden bei der Ozonung beispielsweise Nitrit zu Nitrat, Schwefelwasserstoff zu Sulfat und Cyanide zu Cyanaten, welche in Folgereaktionen zu Kohlendioxid und Stickstoff abgebaut werden können, oxidiert. Bromide und Iodide bilden unter Einfluss von Ozon freie Halogene und entsprechende sauerstoffhaltige Verbindungen. Die üblicherweise vorherrschenden Bedingungen bei der Wasseraufbereitung reichen weder für die Reaktion von Ozon mit Ammonium und Ammoniak noch für die Oxidation des Chlorids aus (Frimmel et al., 1993).

Bei der Ozonung von organischen Wasserinhaltsstoffen reagieren vor allem ungesättigte und heterocyclische Verbindungen ebenso Mercaptane und freie Amine. Auch aromatische Verbindungen mit Ringsubstituenten, welche die Elektronendichte im Ring erhöhen, werden relativ schnell oxidiert (Frimmel et al., 1993). Die direkte Reaktion von molekularem Ozon mit organischen Substanzen kann über den Criegee-Mechanismus erklärt werden (Criegee, 1975, vgl. Kapitel 11.3.3, Figure S8). Hierbei greift das Ozon die Doppelbindung eines Olefins an. Zu Beginn der Reaktion bildet sich ein instabiles Ozonid. Dieses zerfällt in eine Carbonylverbindung und ein Hydroxyhydroperoxid, welches langsam zu einer weiteren Carbonylverbindung abgebaut wird (von Gunten, 2003). Die Reaktionen mit Hydroxyl-Radikationen führen zur Bildung von Alkoholen, Aldehyden, Ketonen und Carbonsäuren (Hoigné, J., 1998). Im Allgemeinen wird durch die Ozonung die Molekülgrößenverteilung des DOC in Richtung kleinerer Moleküle verschoben, was mit einer Erhöhung der Polarität einhergeht. Eine vollständige Mineralisierung der Spurenstoffe durch den Einsatz der Ozonung bei der Trinkwasseraufbereitung wird in der Praxis jedoch nicht erreicht (Schmidt et al., 2010).

2.2.4 Ozonungsversuche im Labormaßstab

Um das Verhalten von Wasserinhaltsstoffen bei der Ozonung beurteilen zu können, werden Ozonungsversuche im Labormaßstab durchgeführt. Die Verwendung von Reinsubstanzen bei den Versuchen ermöglicht die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstante und Reaktionsordnung für die einzelnen Wasserinhaltsstoffe mit Ozon. Mit den im Labormaßstab ermittelten Geschwindigkeitskonstanten lassen sich beispielsweise Vorhersagen treffen, ob mit Hilfe der Ozonung im Falle von kontaminiertem Rohwasser eine Entfernung der entsprechenden Substanz erreicht werden kann (Frimmel et al., 1993). Für viele anorganische und organische Substanzen sind die Ergebnisse der Laborversuche in der Literatur beschrieben (z. B. Hoigné und Bader, 1983; Vel Leitner und Roshani, 2010). Außerdem können mit Laborversuchen die bei der Ozonung gebildeten Oxidationsnebenprodukte identifiziert werden (z. B. Benner und Ternes, 2009; Seitz et al., 2008).

Oxidationsnebenprodukte stellen eine potenzielle Gefährdung des Trinkwassers dar, da diese unter Umständen nicht durch die anschließenden Aufarbeitungsschritte entfernt werden und somit in das Trinkwasser gelangen. In Kapitel 5 (Publikation III, Absatz 2.2) wird die Durchführung eines solchen Ozonungsexperiments am Beispiel von 4- und 5-Methyl-1H-Benzotriazol beschrieben. Der schematische Aufbau einer Ozonversuchsanlage im Labormaßstab ist in Kapitel 6 (Publikation IV, Bild 1) dargestellt. Die Ergebnisse solcher Laborversuche lassen sich jedoch nicht unbedingt auf die Vorgänge bei der Ozonung in der TWA übertragen, da die Laborversuche in reinen Lösungen mit deutlich höheren Konzentrationen angesetzt werden (Frimmel et al., 1993).

2.2.5 Ozonanalytik

Für die Durchführung von Ozonungsexperimenten im Labormaßstab ist eine Bestimmung von Ozon in Wasser erforderlich. In der DIN 38 408-3 sind hierfür drei Methoden aufgeführt. Neben einer iodometrischen Titration sind zwei photometrische Bestimmungen mittels N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamin (DPD) bzw. Indiotrisulfonat beschrieben. Höhere Ozonkonzentrationen werden durch Titration bestimmt, während die photometrischen Verfahren bei niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden.

Das photometrische Analysenverfahren mit DPD ist in einem Konzentrationsbereich von 0,02 - 2,5 mg L⁻¹ anwendbar und daher besonders geeignet für Rohwässer der TWA, Trinkwasser und Wässer mit geringer organischer Belastung. Das DPD wird bei Anwesenheit eines Oxidationsmittels zu einem rotvioletten Radikalkation („Wursters Rot“) oxidiert, dessen Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 510$ nm und pH 6 gemessen wird (DIN 38408-3). Zur Stabilisierung des pH-Werts wird ein Dinatriumhydrogen-/Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer der Probelösung zugegeben. Bei diesem Verfahren reagiert Ozon nicht direkt mit DPD, sondern das

der Probelösung zugegebene Kaliumiodid wird durch das vorhandene Ozon zu Iod oxidiert, welches anschließend mit DPD den entsprechenden roten Farbstoff bildet. Sind Oxidationsmittel, die Iodid zu Iod oxidieren können, in der Lösung vorhanden, wird die Ozonbestimmung gestört.

2.3 Chromatographie

Die moderne Chromatographie basiert auf den Versuchen von Michail Tswett (1872 - 1919). Er trennte einen Chlorophyllextrakt in einer mit Inulin gefüllten Glassäule und nannte diese Methode Chromatographie. Der Name setzt sich aus den griechischen Wörtern „chroma“ (Farbe) und „graphein“ (schreiben) zusammen. Erst dreißig Jahre später wurden die theoretischen Grundlagen erarbeitet. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Arbeiten von Martin und Synge und das Standardwerk der Dünnschichtchromatographie von Stahl (Kaltenböck, 2008). Bei der Chromatographie liegt die stationäre Phase fest oder flüssig vor, die mobile Phase hingegen flüssig oder gasförmig. Einen Überblick gängiger chromatographischer Verfahren liefert Abbildung 2-4. Grundlegendes Kriterium für die Unterscheidung ist der Aggregatzustand der mobilen Phase. Anschließend wird nach dem Aggregatzustand der stationären Phase und deren Konfiguration weiter unterteilt (Cammann, 2001).

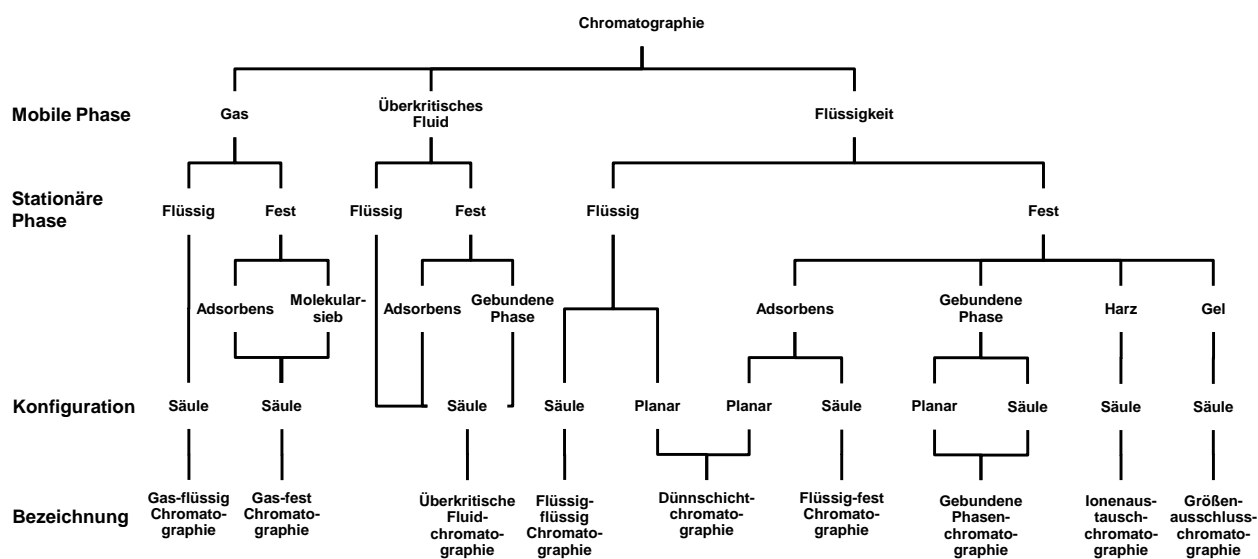


Abbildung 2-4: Klassifizierung nach Art der Phasen (verändert nach Cammann, 2001)

2.3.1 Trennmechanismen der Chromatographie

Bei der Chromatographie werden die Analyten anhand ihrer unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der stationären und mobilen Phase getrennt. Die Trennung beruht auf fünf grundlegenden Mechanismen, die nachstehend beschrieben werden. In der Praxis treten meist mehrere Mechanismen gleichzeitig auf, wobei häufig einer überwiegt (Kaltenböck, 2008).

Die Verteilungschromatographie beruht auf dem Nernst'schen Verteilungsgesetz. Hier sind die unterschiedlichen Löslichkeiten der Analyten in der stationären und mobilen Phase für ihre Trennung verantwortlich. Bei der Adsorptionchromatographie treten zwischen den Analyten und der polaren Oberfläche der stationären Phase neben Dipol-induzierter Dipol- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auch Wasserstoff- und π -Komplex-Bindungen auf (Meyer, 2009). Als stationäre Phase werden überwiegend poröse Kieselgele verwendet. Die Trennung von Ionen gelingt am Besten an einer stationären Phase, die ionische Gruppen (z. B. SO_3^- oder NH_3^+) an der Oberfläche enthält. Gegenionen neutralisieren die Ladungen an der Oberfläche. Die Trennung erfolgt durch reversible Anlagerung der Analytionen an die ionischen Gruppen in Konkurrenz mit den Gegenionen (Meyer, 2009). Bei der Ausschlusschromatographie trennen sich die Moleküle nicht erstrangig bedingt durch Wechselwirkungen der Analyten mit der mobilen und stationären Phase, sondern infolge entropischer Effekte. Durch das verwendete poröse Säulenmaterial steht den Analyten je nach Molekülgröße ein spezifisches Diffusionsvolumen zur Verfügung. Große Moleküle können nicht in die Poren diffundieren und werden deshalb weniger retardiert als kleinere Moleküle (Meyer, 2009). Als stationäre Phase dienen gequollene, polymere Gele in Form sphärischer Partikel. Eine sehr hohe Spezifität weist die Affinitätschromatographie auf. Hierbei sind Liganden an eine Matrix kovalent gebunden, welche mit den Analytmolekülen nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ eine Wechselwirkung eingehen. Als Liganden werden beispielsweise Antigene, Enzyme oder Hormone immobilisiert. Dabei werden spezifische Moleküle angekoppelt, wie Antikörper an Antigene oder Inhibitoren an Enzyme (Gey, 2008).

2.3.2 Chromatographische Kenngrößen

Die graphische Darstellung des Analysensignals der chromatographischen Trennung gegen die Zeit wird als Chromatogramm bezeichnet (Cammann, 2001). Signale von Analyten sind als Gauß-Kurven abgetragen und werden als Peaks bezeichnet (vgl. Abbildung 2-5). Kenngrößen der Peaks, wie die Brutto-Retentionszeit t_R oder Peakhöhe h bzw. Fläche A , liefern wichtige Informationen über den Analyten. Die Brutto-Retentionszeit t_R ist die Zeit, die von der Probeninjektion bis zum Signalmaximum des Analyten verstreicht und ist unter gleich bleibenden chromatographischen Bedingungen (Fließgeschwindigkeit, Säulenlänge etc.) ein Identifikationskriterium. Aufgrund der Proportionalität von Peakhöhe h bzw. Fläche A zur eingesetzten Stoffmenge kann mit Hilfe einer Kalibrierkurve eine Quantifizierung des Analyten erfolgen. Des Weiteren können durch die folgenden Kenngrößen Aussagen über die Güte der Trennung gemacht werden (Meyer, 2009).

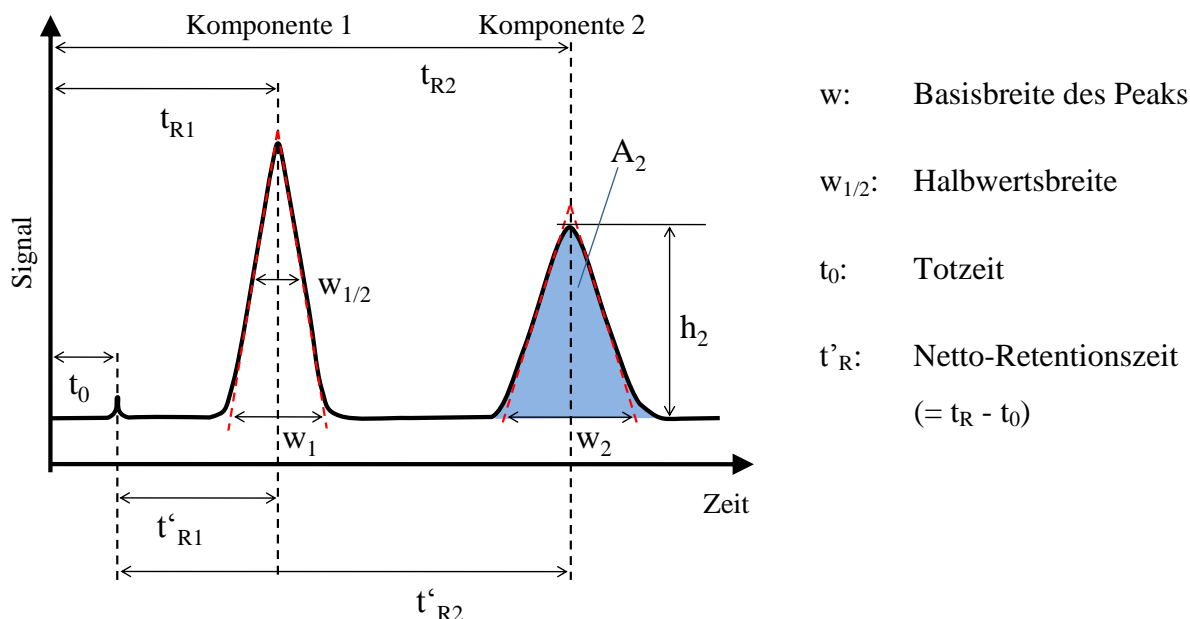


Abbildung 2-5: Chromatographische Kenngrößen (verändert nach Meyer, 2009)

Mittels der Auflösung R , die über den Quotienten des Abstandes der beiden Peakmaxima voneinander definiert ist (Gl. 4), kann eine Aussage über die Trennung zweier symmetrischer Peaks getroffen werden. Wird eine Auflösung $R \geq 0,6$ erreicht, so können die Signale noch eindeutig als zwei verschiedene Peaks erkannt werden. Bei $R \geq 1,25$ ist eine Basislinientrennung der Peaks vorhanden. Dies gilt nur für Peaks gleicher Höhe. Bei unterschiedlichen Peakhöhen ist eine höhere Auflösung erforderlich.

$$R = 2 \frac{(t_{R1} - t_{R2})}{(w_1 + w_2)} \quad (\text{Gl. 4})$$

Der Kapazitätsfaktor k' (Gl. 5) ist eine dimensionslose Größe und unabhängig von apparativen Parametern. Somit ermöglicht er einen Vergleich von Chromatogrammen, die mit unterschiedlichen Säulen oder Flussgeschwindigkeiten gemessen wurden. Kleine Kapazitätsfaktoren weisen auf eine unzureichende Trennung hin, große hingegen auf eine gute Trennung. Jedoch bedeuten große Kapazitätsfaktoren auch eine längere Analysenzeit und schlechtere Nachweisgrenzen aufgrund von Peakverbreiterungen.

$$k' = \frac{t'_R}{t_0} = \frac{(t_R - t_0)}{t_0} \quad (\text{Gl. 5})$$

Die Selektivität α (Gl. 6) ist ein Maß für die Trennbarkeit von zwei Analyten. Ist $\alpha = 1$, so handelt es sich um coeluiierende Peaks. Die Selektivität α ist abhängig von der verwendeten stationären und mobilen Phase.

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Anzahl an theoretischen Böden N gibt Aufschluss über die Güte der Chromatographie. Ein theoretischer Boden entspricht hierbei einer Gleichgewichtseinstellung des Analyten zwischen stationärer und mobiler Phase. N berechnet sich aus dem Quotienten der Trennsäulenlänge L und der Bodenhöhe H (Gl. 7). Eine höhere Anzahl an theoretischen Böden führt zu einer besseren Trennung, jedoch wird dieser Effekt durch die Bandenverbreiterung während der Trennung zum Teil kompensiert.

$$N = \frac{L}{H} \quad (\text{Gl. 7})$$

Die Ursache der Peakverbreiterung wird durch die Van-Deemter-Gleichung (Gl. 8) beschrieben. Die theoretische Bodenhöhe H stellt ein Maß für die Verbreiterung eines Peaks dar (Gey, 2008).

$$H_{(\text{HETP})} = A + \frac{B}{u} + C * u \quad (\text{Gl. 8})$$

Demnach ist H eine Funktion der Streudiffusion A (Eddy-Diffusion), der Longitudinal-Diffusion B (Strömungsverteilung) und der massentransversalen Diffusion C (Stoffaustausch). Die Eddy-Diffusion ist unabhängig von der Lineargeschwindigkeit u und basiert auf der ungleichen Wanderung der Substanzen durch die stationäre Phase. Sie spielt vor allem bei gepackten Säulen eine Rolle und hängt von der Partikelgröße, der Dichte und der Homogenität der Säulenpackung ab (Cammann, 2001). Die Diffusion der Probenmoleküle in Richtung oder gegen die Strömungsgeschwindigkeit der mobilen Phase wird durch den Term B der Van-Deemter-Gleichung beschrieben. Die sogenannte Longitudinal-Diffusion besitzt bei geringen Fließgeschwindigkeiten einen relativ hohen Einfluss auf die Trennstufenhöhe H , verliert aber mit zunehmender Geschwindigkeit ihre Bedeutung. Der Stoffaustauschterm C beruht auf zufälligen Wanderungs- und Aufenthaltsschritten der Analyten. Erfolgt eine Diffusion des Analyten in die Poren der stationären Phase, so wird dieser erst nach Verlassen der Pore von der mobilen Phase weitertransportiert. Er setzt sich additiv aus den Massenkoeffizienten der stationären und mobilen Phase gemäß Gl. 9 zusammen.

$$c * u = c_s * u + C_m * u \quad (\text{Gl. 9})$$

Die Bandenverbreiterung durch den Term C hängt überwiegend von dem Partikeldurchmesser und dem Diffusionskoeffizienten des Analyten in der mobilen und stationären Phase ab und steigt linear mit der Fließgeschwindigkeit an. In Abbildung 2-6 ist der Einfluss der drei Terme auf die Trennstufenhöhe graphisch dargestellt. Aus ihrem Betrag setzt sich die Van-Deemter-Kurve zusammen. Am Tiefpunkt der Kurve wird mit der entsprechenden optimalen Fließgeschwindig-

keit eine minimale Trennstufenhöhe erreicht (Gey, 2008). Zusätzlich zu den beschriebenen Effekten kann das Totvolumen des chromatographischen Systems außerhalb der Säule (z. B. Kapillaren) zu einer weiteren Verbreiterung der Banden führen (Cammann, 2001).

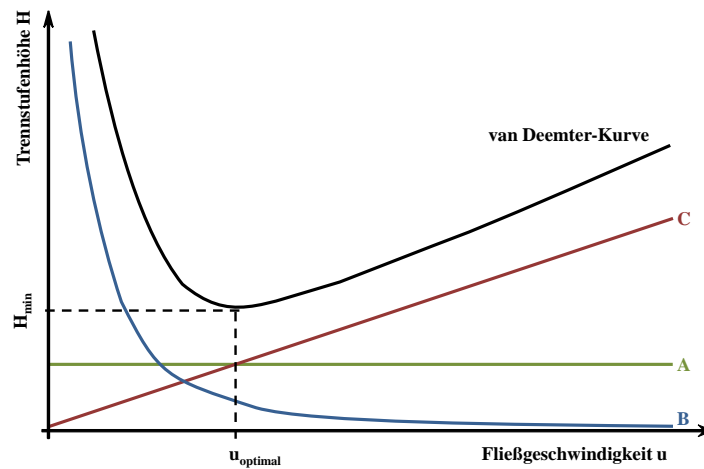


Abbildung 2-6: Van-Deemter-Kurve (verändert nach Gey, 2008).

2.3.3 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl. High performance liquid chromatography) wurde in den 1960er Jahren entwickelt und stellt mit ihrem breiten Anwendungsspektrum eine optimale Ergänzung zur Gaschromatographie dar. Sie wird vor allem zur Trennung von polaren, nicht verdampfenden Analyten eingesetzt. Die zugrunde liegenden Trennmechanismen gleichen denen der allgemeinen Säulenchromatographie. Jedoch werden hierbei der Eluent und die Analyten mit Hilfe von leistungsfähigen Pumpen unter hohem Druck durch das chromatographische Bett der Säule gepumpt. Dadurch wird neben einer kürzeren Analysenzeit auch eine höhere Reproduzierbarkeit erreicht. Der prinzipielle Aufbau eines HPLC-Systems ist in Abbildung 2-7 schematisch dargestellt.

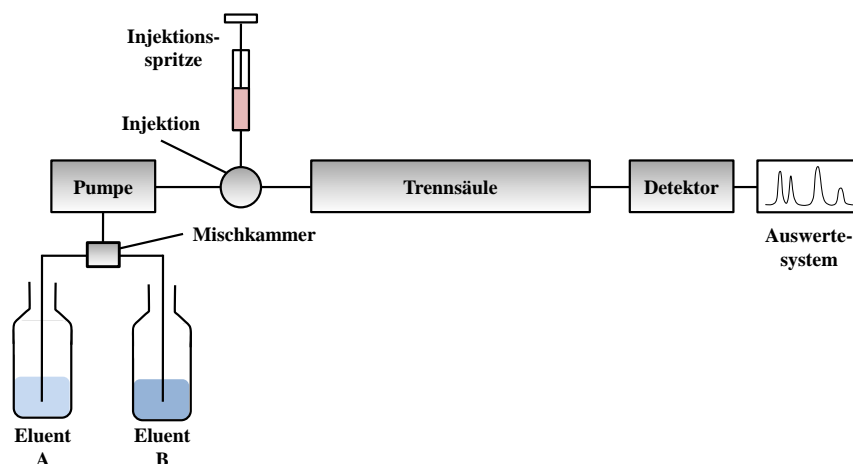


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems (verändert nach Otto, 2006)

Als mobile Phase werden unterschiedliche Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische eingesetzt. Wasser, Methanol und Acetonitril gehören zu den am häufigsten genutzten Eluenten. Sie werden in erster Linie aufgrund ihres Einflusses auf die chromatographische Trennung ausgewählt. Dabei spielen auch Kriterien wie beispielsweise Viskosität, UV-Durchlässigkeit, Brechungsindex, Reinheit und Toxizität unter Umständen eine entscheidende Rolle (Meyer, 2009). Die Entgasung der mobilen Phase ist bei der HPLC extrem wichtig, da durch Kompression gelöstes Gas z. B. im Bereich der Pumpen ausgasen und zu Flussschwankungen führen kann. Dies wirkt sich stark auf die Reproduzierbarkeit der Trennung aus. Ebenso führen Gasblasen bei der Detektion zu nicht reproduzierbaren Messsignalen. Neben der manuellen Entgasung der Eluenten mittels eines Ultraschallbades haben sich die Entgasung mit Helium und die Vakuumentgasung als Online-Methoden etabliert (Cammann, 2001).

Hochleistungspumpen sorgen für einen konstanten Fluss der mobilen Phase durch das HPLC-System. Es handelt sich hierbei häufig um kontinuierliche Kurzhubkolbenpumpen. Die Verwendung von zwei Pumpen führt zu einem möglichst gleichmäßigen Fluss, da während des Füllens der Lösungsmittelkammer der einen Pumpe die andere Pumpe Lösungsmittel durch das System pumpt. Die Bauteile der Pumpen müssen korrosionsbeständig sowie chemisch inert sein und sind deshalb meist aus Edelstahl oder Polyetheretherketon. Die Elution der Analyten von der Säule erfolgt entweder isokratisch oder mit Hilfe eines Gradienten. Bei der isokratischen Elution wird die Zusammensetzung der verwendeten Eluenten konstant gehalten. Die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung während der Gradientenelution führt zu einer veränderten Elutionskraft der mobilen Phase. Dies hat schärfere Peaks und kürzere Laufzeiten zur Folge (Cammann, 2001).

Heute wird die Probeninjektion mit einem automatischen Probensammler durchgeführt. Nach dem Aufsaugen der Probe in die Probenschleife wird durch Umschalten des Sechs-Wege-Ventils der Eluentenfluss über die gefüllte Schleife geleitet und so die Probe in Richtung der Säule gespült. In der Umweltanalytik sind Injektionsvolumina von 10 - 100 μL üblich.

Zur Trennung werden gewöhnlicherweise Normal- (NP) und Umkehrphasen (RP) als Säulenmaterial benützt. Bei der NP-Chromatographie handelt es sich bevorzugt um Kieselgele als stationäre Phase, aber auch Aluminiumoxide kommen zum Einsatz. Durch die freien Silanolgruppen der sphärischen bzw. irregulären Kieselgelpartikel besitzt die stationäre Phase eine höhere Polarität als die verwendeten Eluenten (z. B. Hexan). Bei der Analytik z. B. von Kohlenwasserstoffen wird häufig mit der NP-Chromatographie gearbeitet (Gey, 2008). Für die RP-Chromatographie werden hingegen chemisch modifizierte Kieselgele eingesetzt. Die Silylierung der Silanolgruppen mit alkylsubstituierten Silanen führt zu einer hydrophoben Oberfläche der stationären Phase; es ist jedoch auch eine Modifizierung mit polaren Gruppen (Amino-, Diol- oder Nitro-Gruppen) möglich. Weiter werden vielfach vernetzte Copolymere zur Herstellung von

RP-Säulen benützt. Säulenpackungen, die aus entsprechenden Polymerphasen bestehen, besitzen eine deutlich höhere pH-Stabilität als kieselgelbasierende Materialien.

Bei der RP-Chromatographie kommt überwiegend Wasser in Kombination mit Methanol oder Acetonitril als Eluent zum Einsatz (Cammann, 2001). Wegen der vielen Modifikationsmöglichkeiten von Kieselgel mit unterschiedlichen chemischen Gruppen und den daraus resultierenden großen chromatographischen Anwendungsgebieten ist die RP-Chromatographie in der Umweltanalytik weit verbreitet. Die Partikelgrößen einer üblichen HPLC-Säule liegen im Bereich von $< 2 - 5 \mu\text{m}$. Das zur Trennung verwendete Säulenmaterial sollte angesichts der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Eddy-Diffusion (A-Term, Van-Deemter-Gleichung) eine möglichst homogene Verteilung der Partikelgrößen und der Porendurchmesser aufweisen. Um reproduzierbare Retentionszeiten zu erhalten, wird die HPLC-Säule während der Analysen im Säulenofen temperiert. Nach der erfolgreichen Trennung werden die Analyten in den Detektor überführt.

Die Nano-HPLC stellt eine spezielle Art der Flüssigkeitschromatographie dar. Sie unterscheidet sich prinzipiell in ihrer ursprünglichen Form als Kapillar-HPLC von der gewöhnlichen HPLC nur in der Dimension der Kapillaren und der Säule sowie dem verwendeten Eluentenfluss, jedoch nicht im technischen Aufbau. Durch den Eluentenfluss im Bereich von wenigen Hundert nL min^{-1} liegen bei der Injektion gleicher absoluter Probenmengen im Vergleich zu der HPLC höhere Analytkonzentrationen am Detektor vor, was zu einer deutlich besseren Empfindlichkeit des Analysensystems führt (Groleau et al., 2008). Infolge der Empfindlichkeitssteigerung sind nur sehr geringe Probenvolumina für die Analysen mittels Nano-HPLC notwendig. Jedoch, um bei diesen sehr geringen Flussraten eine ausreichende Reproduzierbarkeit erreichen zu können, ist der Gebrauch von speziellen Nano-Pumpen und einem Analysensystem erforderlich, das auf ein minimales Totvolumen optimiert ist. Selbst der Einsatz von herkömmlichen auf Totvolumen optimierten Verbindungen kann schon zu einer deutlichen Peakverbreiterung und somit zu einer geringeren Empfindlichkeit führen. Die Reproduzierbarkeit und Robustheit der Analyse wird dadurch ebenfalls negativ beeinflusst. Des Weiteren stellen das Auffinden von Undichtigkeiten und die Verstopfungen von Kapillaren und der Säule bei der Verwendung der Nano-HPLC ein Problem dar (Yin et al., 2005).

Durch die Entwicklung des HPLC-Chips und des Chip-Cube-MS-Interfaces (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) wurde eine deutlich bessere Handhabung und Leistungsfähigkeit der Nano-HPLC-Technik erreicht. In dem aus geschichteten Polyimid bestehenden Nano-HPLC-Chip ist neben einer Anreicherungssäule, einer analytischen Trennsäule, Verbindungskapillaren sowie elektrischen Kontakten auch die Nano-Elektrospraynadel integriert (siehe Abbildung 2-8). Angesichts dieser kompakten Anordnung der Transferkapillaren und Verbindungen ist das Totvolumen und dadurch die Peakverbreiterung nach der Trennsäule auf ein Minimum reduziert (Fortier et al., 2005; Ghitun et al., 2006). Auf die sechs Bohrungen des Nano-

HPLC-Chips wird im Betriebszustand das Sechs-Wege-Ventil von vorne und hinten aufgepresst. Der Nano-HPLC-Chip wird durch das Chip-Cube-MS-Interface automatisch installiert. Da das Volumen der analytischen Säule im Verhältnis zu dem Injektionsvolumen relativ klein ist, erfolgt immer zuerst eine Aufkonzentrierung der Analyten auf der Anreicherungssäule.

Die Beladung der Anreicherungssäule wird mit einer Kapillarpumpe und einer Flussrate von 1000 - 4000 nL min⁻¹ durchgeführt, da die Probenanreicherung mit Flüssen im nL min⁻¹-Bereich sehr zeitintensiv wäre. Durch Umschalten des Sechs-Wege-Ventils werden die Analyten von der Anreicherungssäule auf die analytische Trennsäule eluiert. Dies geschieht mit der Nano-Pumpe bei einer Flussrate von 100 - 400 nL min⁻¹. Die Funktionsweise ist in Abbildung 2-8 schematisch dargestellt. Durch entsprechende Wahl des Umschaltzeitpunkts für das Sechs-Wege-Ventil kann verhindert werden, dass die Salzfracht einer Probe über die Anreicherungs- und Trennsäule in die Ionenquelle gelangt und dort die Ionisation beeinflusst. Nach der Trennsäule erfolgt die Elektrospray-Ionisation der Analyten. Je nach analytischer Fragestellung sind HPLC-Chips mit unterschiedlichsten Anreicherungs- und Trennsäulen sowie Packungsmaterialien erhältlich.

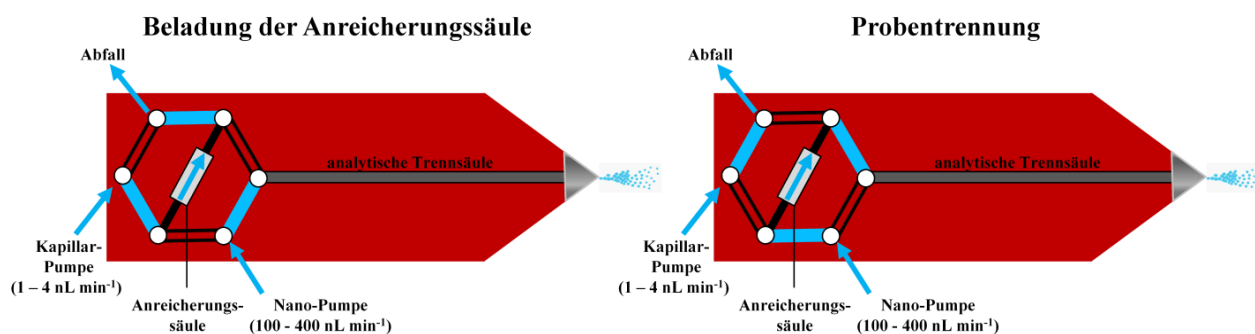


Abbildung 2-8: Darstellung des Nano-HPLC-Chips und dessen Funktionsweise (verändert nach Buckenmaier et al., 2008)

Prinzipiell kann die HPLC mit vielen unterschiedlichsten Detektionstechniken gekoppelt werden. Neben dem Fluoreszenz- und Diodenarray-Detektor (DAD) wird die HPLC häufig in Kombination mit einem Massenspektrometer eingesetzt. Nachfolgend wird die Funktionsweise eines DAD näher erläutert. In Kapitel 2.4 sind die Grundlagen Massenspektrometrie näher beschrieben.

Grundlage der UV/VIS-Absorption ist im Allgemeinen die Anregung von Valenzelektronen der Moleküle durch das Licht im Wellenlängenbereich von ca. 200 - 800 nm. Besitzen die Moleküle freie Elektronen von Heteroatomen oder Doppelbindungen, so lassen sich diese mit Hilfe der UV/VIS-Absorption detektieren. Mit dem Anstieg der Anzahl an konjugierten Doppelbindungen in einem Molekül wird das Absorptionsmaximum in Richtung höherer Wellenlängen verschoben (Bathochromie). Rückt das Maximum in die entgegengesetzte Richtung, spricht man von Hypsochromie (Gey, 2008). Bei der Bestimmung der UV/VIS-Absorption in Flüssigkeiten werden aufgrund von Stoßvorgängen in der Lösung deutlich breitere Absorptionsbanden erhalten als in der Gasphase (Cammann, 2001). Für die Quantifizierung der UV/VIS-Absorption wird das

Lambert-Beer'sche Gesetz (Gl. 10) herangezogen. Dieses ist streng genommen nur für monochromatisches Licht und Lösungen, in denen der Analyt homogen verteilt ist und keine Wechselwirkungen zwischen den Analyten auftreten, gültig. Die Extinktion E_λ (dimensionslos) ist gemäß des Lambert-Beer'schen Gesetzes das Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten ϵ_λ ($\text{cm}^2 \text{mmol}^{-1}$), der Konzentration c (mol L^{-1}) und der Schichtdicke d (cm) der Küvette. Sie entspricht dem logarithmischen Quotienten der Intensität des einfallenden und ausfallenden Lichtstrahls (I_0 bzw. I).

$$E_\lambda = \epsilon_\lambda * c * d = \log \left[\frac{I_0}{I} \right]_\lambda \quad (\text{Gl. 10})$$

Abbildung 2-9 erklärt schematisch den Aufbau eines DAD. Als Lichtquelle wird meist eine Deuteriumlampe in Kombination mit einer Wolframlampe verwendet. Das polychromatische Licht (190 - 800 nm) wird durch optische Linsen gebündelt in die Messzelle eingestrahlt und danach an einem Polychromator (Prisma oder Gitter) spektral aufgeteilt. Die einzelnen Wellenlängen des kompletten Spektrums werden anschließend mit einem Diodenarray simultan detektiert. Die Auflösung eines üblichen Diodenarrays liegt bei etwa 1 - 2 nm pro Diode und ist wegen der breiten Absorptionsbanden in Lösungen somit hoch genug, um präzise Messdaten zu erhalten (Cammann, 2001). Der Datensatz eines DAD beinhaltet die Intensitäten aller Wellenlängen in Abhängigkeit von der Zeit.

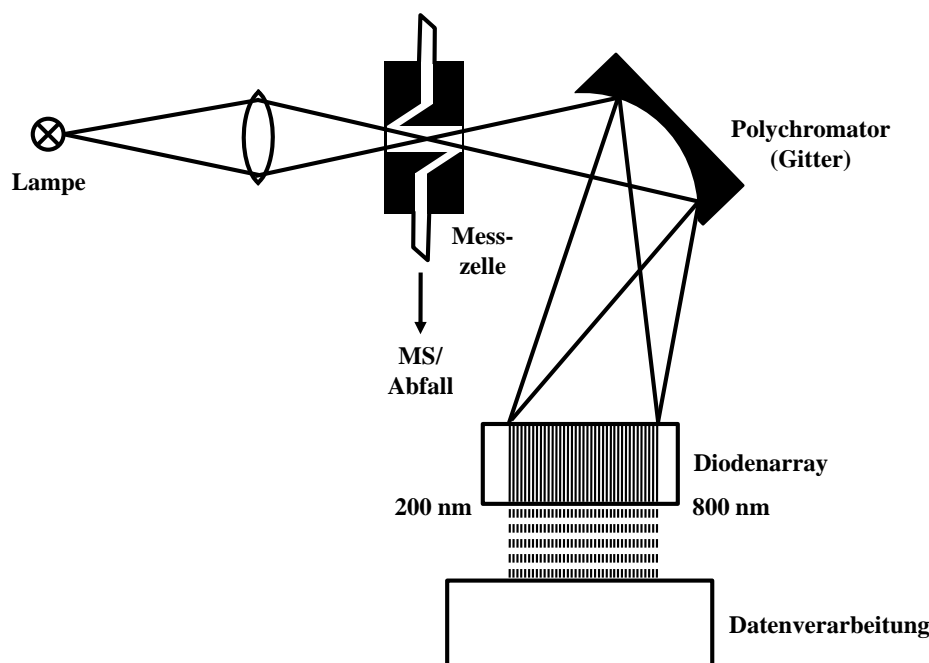


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung eines Diodenarray-Detektors (verändert nach Meyer, 2009)

2.3.4 Hochleistungsdünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (TLC, engl. thin-layer chromatography) wurde erstmals im Jahre 1938 von den beiden Forschern N.A. Izmailov und M.S. Shraiber vorgestellt. Bis heute wird diese Technik stetig weiterentwickelt. Entscheidende Grundlagen dafür waren unter anderem die Arbeiten von E. Stahl und J.G. Kirchner. E. Stahl prägte den Begriff der TLC. Heute wird aufgrund der Leistungsfähigkeit dieser Technik von der Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC, engl. high performance thin-layer chromatography) gesprochen (Sherma und Morlock, 2008). Die HPTLC ermöglicht die simultane und damit zeit- und kostensparende Trennung einer Vielzahl an Proben. Die stationäre Phase befindet sich auf einer Glasplatte, Kunststoff- oder Aluminiumfolie. Bei der HPTLC werden Schichtdicken von ca. 100 µm benützt. Die Partikeldurchmesser der stationären Phase betragen 5 µm oder kleiner. Die dadurch erreichte Trenneffizienz liegt bei einer Trennstrecke von 4 cm bei etwa 4000 theoretischen Böden (Gey, 2008). Als NP-Materialien finden neben Silicagelen und Aluminiumoxid auch Cellulose und Kieselgur Verwendung. Außerdem sind unterschiedlichste RP-Phasen erhältlich (Cammann, 2001). Ein Großteil der Analysen mittels HPTLC wird auf Platten mit NP-Materialien durchgeführt. Hierbei stellt die Adsorption den vorherrschenden Trennmechanismus dar. Die mobile Phase wandert in der stationären Phase aufgrund der Kapillarkräfte. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt deshalb mit zunehmender Distanz zwischen Lösungsmittelfront und Eintauchlinie der HPTLC-Platte in der mobilen Phase ab. Da bei der HPTLC-Trennung die Substanzgemische auf der Platte räumlich getrennt werden und nicht wie bei der HPLC zeitlich, wird hier von orts aufgelösten Substanzbanden gesprochen. In Abbildung 2-10 ist der schematische Ablauf einer HPTLC-Trennung dargestellt. Durch den Retentionsfaktor R_f wird das Retentionsverhalten der Analyten unter bestimmten chromatographischen Bedingungen beschrieben. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis der Migrationsdistanz des Analyten z_R zu der Migrationsdistanz der Fließmittelfront z_M (vgl. Gl. 11, Gey, 2008).

$$R_f = \frac{z_R}{z_M} \quad (\text{Gl. 11, vgl. Abbildung 2-10})$$

Neben dem Fließmittel wird der R_f -Wert überwiegend von der Schichtdicke, der Temperatur und der Sättigung des Kammervolumens mit den Lösungsmitteldämpfen bestimmt. Werden die Migrationsdistanzen auf eine Standardsubstanz bezogen, erhält man relative Retentionswerte (vgl. Gl. 12, Cammann, 2001).

$$R_{rel} = \frac{R_f(i)}{R_f(st)} \quad (\text{Gl. 12})$$

Ein entscheidender Vorteil der HPTLC gegenüber der HPLC oder GC ist, dass auch nicht chromatographierbare Analyten detektiert werden können. Außerdem führen solche immobilen

Substanzen nicht zu einer dauerhaften Verschmutzung der stationären Phase, da HPTLC-Platten üblicherweise nur einmal zum Einsatz kommen (Wippo, 2003).

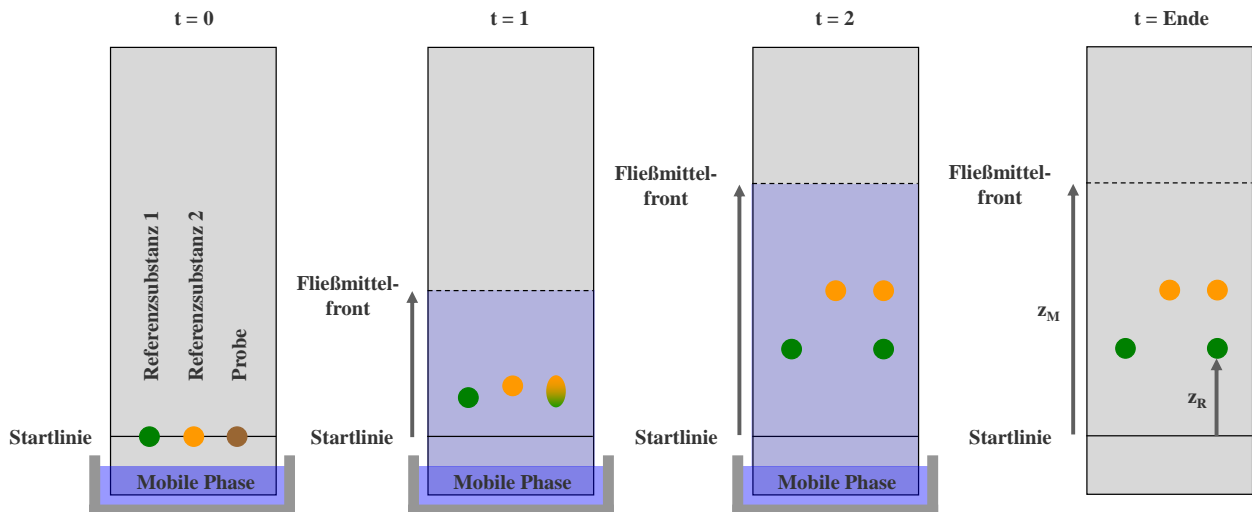


Abbildung 2-10: Schematischer Ablauf der HPTLC

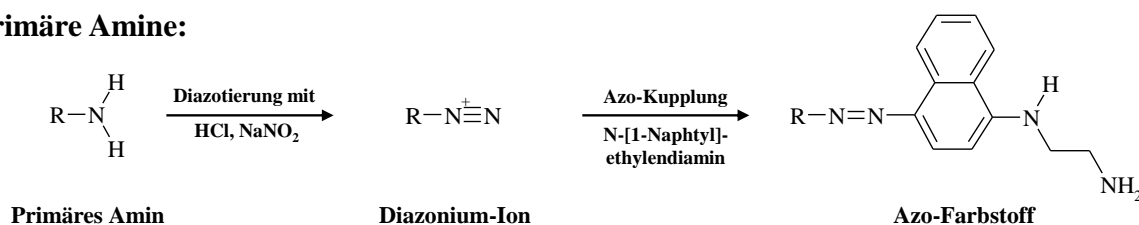
Um die Trennleistung zu steigern, wird heute die automatisierte Mehrfachentwicklung (AMD, engl. automated multiple development,) eingesetzt. Die HPTLC-Platte wird hierbei nach Auftragung der Probe in bis zu 40 einzelnen Stufen entwickelt, wobei jede aufeinanderfolgende Stufe eine höhere Migrationsstrecke ($\Delta 1 - 3 \text{ mm}$) der Lösungsmittelfront besitzt. Zwischen den einzelnen Entwicklungsschritten wird das Lösungsmittel aus der Entwicklungskammer abgezogen und durch Anlegen eines Vakuums wird das restliche Lösungsmittel nahezu vollständig aus dem Sorbens entfernt. Nach der Belüftung der Entwicklungskammer mit Stickstoff wird erneut Fließmittel hineingepumpt. Die Abfolge der Arbeitsschritte (Entwicklung der Platte, Absaugen des Lösungsmittels, Trocknung unter Vakuum, Belüftung mit Stickstoff, Mischen des Fließmittels und Befüllen der Kammer) ist automatisiert. Durch die Änderung der Lösungsmittelzusammensetzung zwischen den verschiedenen Stufen wird eine Gradientenelution erreicht (Wippo, 2003). Diese Technik wurde erstmals von Burger (1984) beschrieben. Ein HPTLC/AMD-Elutionsgradient für Kieselgel beginnt polar und endet unpolar (vgl. Kapitel 11.2, Publikation V, Bild 2). Die Anwendung der Mehrfachentwicklung mit Gradientenelution führt zu schärferen Substanzbanden und somit zu einer höheren Trennleistung (Burger, 1984) und konnte unter anderem erfolgreich für die Analyse von Pestiziden in der aquatischen Umwelt eingesetzt werden (De la Vigne et al., 1991; Burger et al., 1996).

Die Detektion der bei der HPTLC getrennten Substanzen erfolgt mittels unterschiedlicher Detektionsarten. Da die meisten Substanzen keine Eigenfärbung aufweisen, ist eine direkte visuelle Erkennung von Substanzbanden nur in Ausnahmefällen möglich. Normalerweise ist der stationären Phase ein UV-Indikator zugesetzt, der die HPTLC-Platte unter UV-Licht grün bzw.

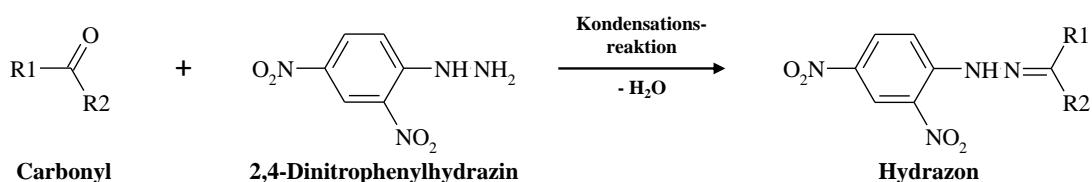
bläulich fluoreszieren lässt. Dadurch erscheinen Substanzen, die bei diesem Wellenlängenbereich absorbieren, als dunkle Banden auf der Platte (Cammann, 2001).

Durch die Remissionsmessung von Substanzen ist es möglich, UV/VIS-Spektren oder ein UV- bzw. VIS-Chromatogramm von Probenbahnen aufzunehmen. Weiter können Substanzen durch Aufsprühen von Reagenzlösungen bzw. durch Tauchung der HPTLC-Platte in Reagenzlösung sichtbar gemacht werden. Wird z. B. Schwefelsäure als Reagenz benützt, erscheinen organische Verbindungen als dunkle Flecken. Derivatisierungsreagenzien, die hingegen nur mit bestimmten funktionellen Gruppen reagieren, können zusätzlich zur Strukturaufklärung angewandt werden. In Abbildung 2-11 sind beispielhaft mögliche Derivatisierungsreaktionen für primäre Amine (Pläß, 2006), Carbonyle (Jork et al., 1989) und Aldehyde (Rahn und Schlenk, 1973) aufgeführt. Eine umfassende Übersicht möglicher Derivatisierungen auf der HPTLC-Platte bieten Jork et al. (1989) und Jork et al. (1994).

Primäre Amine:



Carbonyle:



Aldehyde:

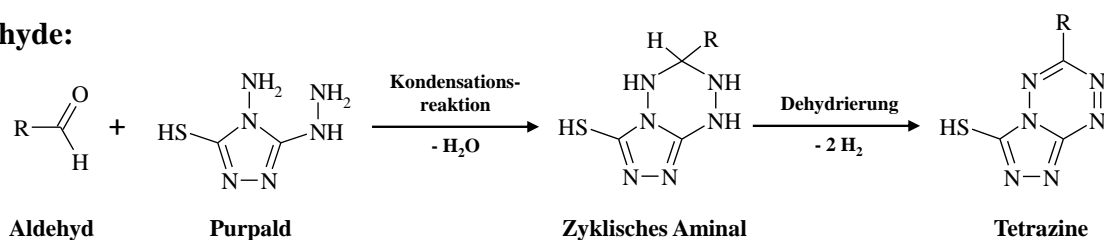


Abbildung 2-11: Auswahl an möglichen Derivatisierungsreaktionen auf der HPTLC-Platte

Durch das Aufbringen von Testorganismen oder Enzymen auf die HPTLC-Platte kann eine wirkungsbezogene Detektion erfolgen. Hierbei wird die Hemmung von Substanzen auf Testorganismen wie z. B. auf *Vibrio fischeri* (Eberz et al., 1996; Weins und Jork, 1996; Schulz et al., 2008) oder Enzymreaktionen (z. B. durch den Acetylcholinesterasehemmtest; Mendoza, 1973) ermittelt.

Die Kopplung der HPTLC mit der Massenspektrometrie wird seit der Entwicklung des TLC-Extraktors nach Luftmann in vielen analytischen Bereichen verstärkt eingesetzt (Morlock und Schwack, 2010). Durch den TLC-Extraktor können Substanzen in kurzer Zeit und in einem kleinen Extraktionsvolumen ohne Querkontamination von der HPTLC-Platte extrahiert und in ein Massenspektrometer überführt werden (Luftmann, 2004; Jautz und Morlock, 2006). Hierzu wird der Stempel des TLC-Extraktors auf die Substanzbande fest aufgepresst, sodass die Schneide des Stempels den Substanzfleck umschließt und ihn von der restlichen stationären Phase abtrennt (Abbildung 2-12). Der Eluent wird mit Hilfe einer HPLC-Pumpe durch die sich innerhalb der Schneide befindliche stationäre Phase gepumpt. Der Filter hält sich lösendes Material der stationären Phase zurück. Der Extrakt wird entweder direkt vom Extraktor in die Ionenquelle des MS geleitet oder in einem Vial aufgefangen und anschließend mittels HPLC-MS analysiert. Die Kombination der HPTLC/AMD mit der HPLC-MS kann zur Identifikation von unbekanntem Spurenstoffen eingesetzt werden (Müller et al., 2010; Müller et al., 2011).

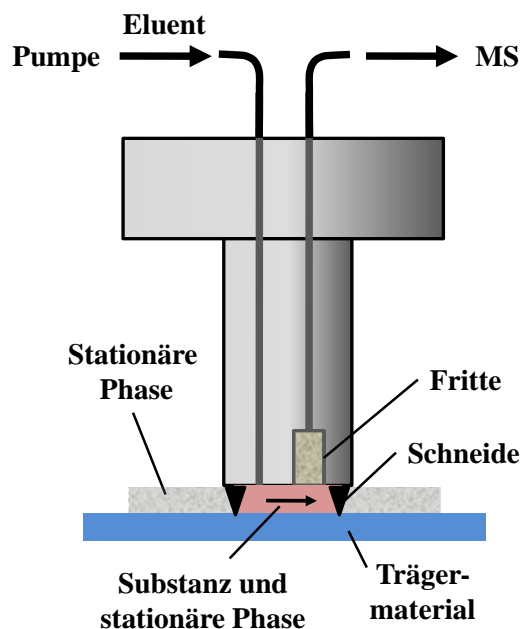


Abbildung 2-12: Schematische Darstellung des Extraktionsstempels (verändert nach Luftmann, 2004)

2.4 Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um ein physikalisches Verfahren, das Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis (m/z -Verhältnis) trennt. Um einen Empfindlichkeitsverlust durch Streuung und Stöße an Luftteilchen zu verhindern, werden Massenspektrometer ausschließlich unter Hochvakuum betrieben. Die Massenspektrometrie zeichnet sich durch ihre hohe Selektivität, Nachweisstärke und Empfindlichkeit aus und eignet sich daher sowohl für qualitative als auch quantitative Analysen. Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle mit Einlasssystem, einem Massenanalysator und einem Detektor (Abbildung 2-13). Je nach Ionisierungsart und Massenanalysator können Moleküllionen bis zu einer Masse von ca. 1,5 MDa und einer Genauigkeit von < 1 ppm detektiert werden. Die Kopplung der Massenspektrometrie mit den unterschiedlichsten Chromatographietechniken ist derzeit bei der Charakterisierung von organischen Spurenstoffen Routine (Cammann, 2001).

Bei der vorliegenden Arbeit wurden überwiegend HPLC-MS-Analysen von Wasserproben und deren SPE-Extrakte durchgeführt. Im Folgenden werden nun die Grundlagen der dabei angewendeten Ionisierungs-, Massentrenn- und Detektionstechniken (Abbildung 2-13 blau markiert) näher erläutert.

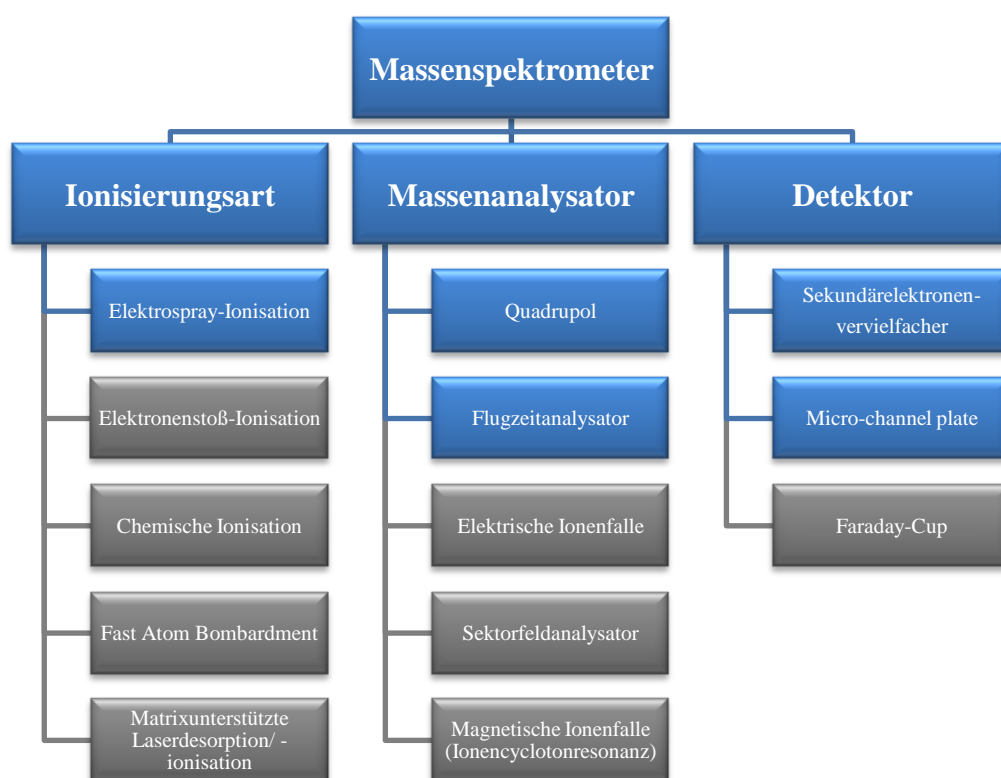


Abbildung 2-13: Übersicht der Bestandteile eines Massenspektrometers (verändert nach Sarioglu, 2003)

2.4.1 Elektrospray-Ionisation

Bei der kombinierten Anwendung der HPLC mit einem MS müssen die in Lösung vorliegenden Analytmoleküle ionisiert und in die Gasphase überführt werden. Dies stellte lange Zeit ein großes Problem dieser Kopplung dar. Die Grundlagen einer Atmosphärendruckionisation wurden zwar schon 1968 von Dole et al. beschrieben, jedoch dauerte die Entwicklung einer für die HPLC-MS geeigneten Elektrospray-Ionisations-Quelle bis Ende der 1980er Jahre (Fenn et al., 2003). Diese Entwicklung war der Durchbruch und etablierte die HPLC-MS in der Umweltanalytik (Barceló und Petrovic, 2007). Die Verleihung des Nobelpreises 2002 an Fenn unterstreicht die Bedeutung dieser Technik. Heute werden bei der HPLC-MS typischerweise neben der Elektrospray-Ionisation (ESI) die chemische Ionisation (APCI, engl. Atmospheric pressure chemical ionisation) und die Photoionisation (APPI, engl. Atmospheric pressure photo ionisation) eingesetzt, wobei die ESI die dominierende Technik darstellt. Die Ionisation erfolgt bei allen drei Techniken unter Atmosphärendruck. Da es sich um sogenannte weiche Ionisierungsmethoden handelt, eignen sie sich für die Ionisierung von thermolabilen, polaren und nicht flüchtigen Substanzen.

Die bei der ESI ablaufenden Vorgänge lassen sich in drei Schritte unterteilen (Abbildung 2-14): Verneblung der Probenlösung in elektrisch geladene Tröpfchen, Freisetzung der Ionen aus den Tröpfchen und der Transport der Ionen in das Hochvakuum des Massenspektrometers (Bruins, 1998). Die Probenlösung mit den Analyten wird durch die Spraynadel geleitet. Zwischen der Spraynadel und der MS-Öffnung liegt eine Spannung von 2 - 5 kV an. Im Gegensatz zur Abbildung 2-14 ist heute die Spraynadel meist orthogonal zu MS-Öffnung angeordnet. Dadurch wird der Anteil an Neutralteilchen, die in das MS gelangen, stark reduziert. Die Polarität wird bei dem positiven ESI-Modus (ESI+) so gewählt, dass die Spraynadel positiv und die Transferkapillare negativ geladen ist (vgl. Abbildung 2-14). Bei dem negativen ESI-Modus (ESI-) wird die Polarität entgegengesetzt gewählt. Es entstehen hierbei überwiegend durch Protonierung (ESI+) bzw. Deprotonierung (ESI-) sogenannte Pseudomolekülionen ($[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^+$). Ferner können sich aber auch Adduktionen mit Ammonium-, Natrium-, Kalium-, Chlorid- oder Acetat-Ionen bilden.

Die angelegte Spannung führt beim positiven ESI+ dazu, dass durch elektrostatische Abstoßung der in Lösung vorliegenden positiv geladenen Ionen und der Oberflächenspannung der Probenlösung ein Taylor-Konus ausgebildet wird. Übersteigt die Coulomb-Abstoßung die Oberflächenspannung, trennt sich ein Lösungsmitteltropfen mit einem Überschuss an positiver bzw. negativer Ladung von der Spraynadel ab (Cole, 2000; Cech und Enke, 2001). Die Bildung von sehr feinen Tröpfchen wird durch die Verneblung der Probenlösung mit Stickstoff gefördert.

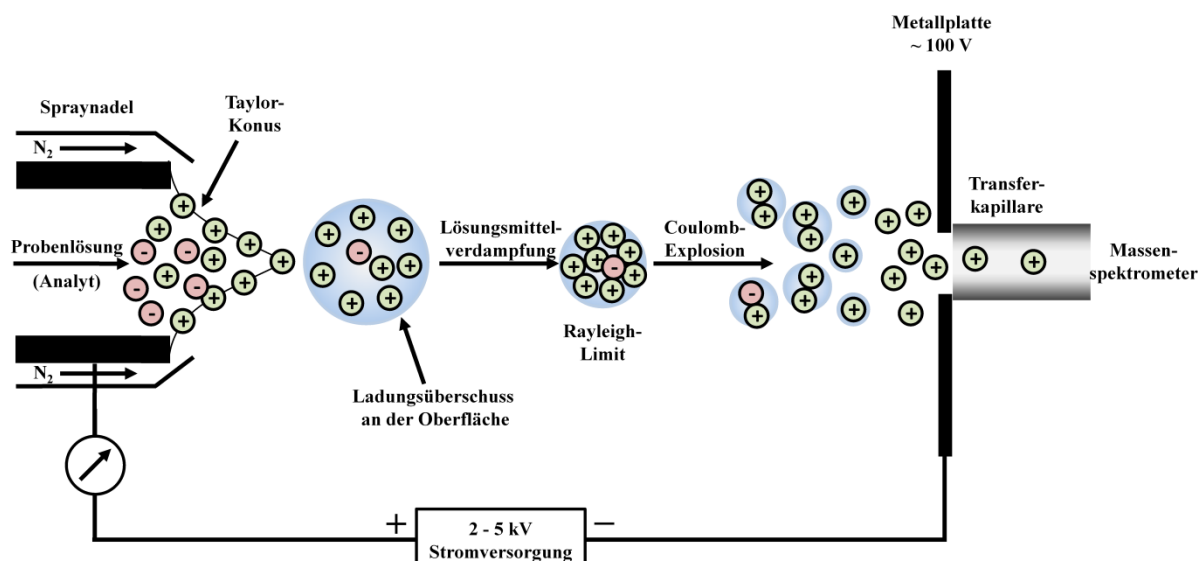


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung einer ESI-Quelle mit den darin ablaufenden Prozessen (verändert nach Cech und Enke, 2001)

Verdampft das Lösungsmittel, verkleinert sich der Primärtropfen auf dem Weg zur Transferkapillare. Dies kann durch einen Inertgasgegenstrom und thermische Energiezufuhr verstärkt werden. Die Abnahme des Tropfenradius führt zu einer erneuten Zunahme der elektrostatischen Abstoßungskräfte bis das Rayleigh-Limit erreicht wird. Das Rayleigh-Limit beschreibt den Gleichgewichtszustand zwischen Oberflächenspannung und Coulomb-Abstoßung (vgl. Gl. 13; Kebarle, 2000; Iavarone und Williams, 2003).

$$q = 8\pi\sqrt{\varepsilon_0\gamma R^3} \quad (\text{Gl. 13})$$

q = Ladung des Tropfens
 ε_0 = Permittivität des Vakuums
 γ = Oberflächenspannung der Flüssigkeit
 R = Radius des Tropfens

Wird das Rayleigh-Limit jedoch überschritten, so zerfällt der Primärtropfen in viele kleine Tröpfchen. Dieser Vorgang ist als Coulomb-Explosion bekannt. Die dabei entstehenden Tröpfchen besitzen ~ 2 % der Masse des Primärtropfens, aber ~ 15 % der Ausgangsladung. Durch weitere Schrumpfung der Tröpfchen wiederholt sich der Vorgang der Coulomb-Explosion mehrmals, bis am Schluss das einzelne Analyt in die Gasphase übertritt. Für die Bildung von Gasphasenionen existieren zwei verschiedene Modelle (Abbildung 2-15).

Bei dem Modell des geladenen Rückstandes (CRM, engl. Charged residue model, Dole et al., 1968) wird davon ausgegangen, dass die geladenen Tröpfchen solange kleiner werden, bis sie nur noch jeweils ein Analyt enthalten. Nachdem Verdampfen des restlichen Lösungsmittels liegt

das Ion in der Gasphase vor. Das Ionen-Emission-Modell (IEM, engl. Ion emission model, Iribarne und Thomson, 1976) beschreibt hingegen den direkten Übergang der Ionen aus dem hochgeladenen Mikrotropfen in die Gasphase. Prinzipiell erfolgt der Übergang der Ionen in die Gasphase auf beiden Wegen, jedoch wird angenommen, dass der Vorgang für Makromoleküle eher nach dem CRM und für kleine Moleküle nach dem IEM abläuft (Kebarle, 2000).

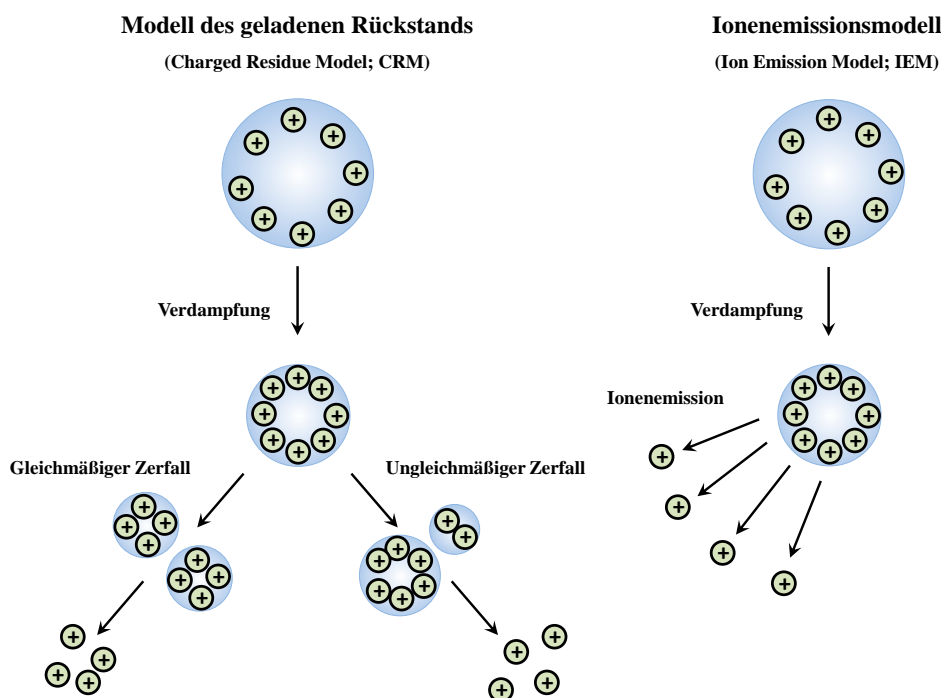


Abbildung 2-15: Vergleich der Modelle zur Ionenbildung bei der ESI (verändert nach Seitz, 2007)

Ein optimaler Ionisierungsgrad wird bei der Verwendung der ESI mit Hilfe geringer Flussraten (z. B. nL min^{-1}) erreicht (Gaskell, 1997). Die Nano-ESI ist eine Voraussetzung für die Kopplung der Nano-HPLC mit der Massenspektrometrie. Die im Nano-Spray erzeugten Tröpfchen ($< 200 \text{ nm}$) sind deutlich kleiner als die der Standard-ESI ($1 - 2 \mu\text{m}$) und besitzen ein 100 - 1000-fach kleineres Volumen (Wilm und Mann, 1994; Gross, 2004). Dadurch werden Tröpfchen mit einem höheren Ladungs-zu-Volumen-Verhältnis erzeugt. Dies führt zu einer größeren Ionisationseffizienz und somit zu einer höheren Empfindlichkeit des HPLC-MS-Systems. Außerdem besitzt die Nano-ESI eine größere Toleranz für Proben mit erhöhter Salzfracht, da aufgrund der kleinen Tröpfchen eine Aufkonzentrierung von Salzen in Lösung vermieden wird (Gaskell, 1997). Der geringe Fluss bei der Nano-ESI hat weiter den Vorteil, dass das Nano-Spray sich ohne Verwendung eines Zerstäubergases nur durch das Anlegen des elektrischen Feldes ausbildet.

2.4.2 Wichtige Begriffe der Massenspektrometrie

Das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) stellt die physikalische Eigenschaft des Analytens dar, welches von den Massenanalysatoren erfasst wird. Die ESI erzeugt bei nieder-

molekularen Analyten überwiegend einfach geladene Pseudomolekülonen. Für mehrfach geladene Ionen treten m/z -Werte auf, die folglich kleiner sind (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Als Bezugspunkt für die atomare Masseneinheit wird gemäß der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) die ^{12}C -Skala verwendet. Die Masseneinheit [u] entspricht per Definition exakt einem 1/12 der Masse des Kohlenstoffisotops ^{12}C und beträgt $1,6605402 \cdot 10^{-27}$ kg. Die oftmals in der biochemischen Literatur vorkommende Masseneinheit Dalton [Da] ist mit der atomaren Masseneinheit identisch (Murray et al., 2006; Budzikiewicz und Schäfer, 2005).

In der Massenspektrometrie werden zusätzlich noch weitere unterschiedliche Definitionen von Atom-, Molekül- und Ionenmassen benützt (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Für ihre Berechnung spielen die verschiedenen Isotope der Elemente und deren relative Häufigkeit (Molenbruch) eine wichtige Rolle. Bei Isotopen handelt es sich um Spezies eines Elements, welche sich nur in der Anzahl an Neutronen und nicht in der Anzahl der Protonen und Elektronen unterscheiden. Die nominelle Masse spiegelt die gerundete ganzzahlige Masse des häufigsten Isotops eines Elements wieder. Die Isotopenmasse hingegen stellt die Masse eines speziellen Isotops dar (vgl. Tabelle 2-3). Bei der monoisotopischen Masse handelt es sich um die exakte Masse des häufigsten Isotops eines Elements. Für die Berechnung der monoisotopischen Masse von Molekülen werden die monoisotopischen Massen der Elemente herangezogen. Die entsprechenden exakten Ionenmassen werden durch Addition bzw. Subtraktion der Masse(n) eines oder mehrerer Elektronen ermittelt (Gross, 2004).

Die Massendifferenz zwischen der ganzzahligen Masse eines Elements und der Isotopenmasse wird als Massendefekt bezeichnet und ist mit der Bindungsenergie, welche das Atom zusammenhält, gleichzusetzen. Deshalb besitzt auch jedes Isotop einen charakteristischen Massendefekt (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Der Massendefekt eines Moleküls berechnet sich additiv aus den einzelnen Massendefekten der Elemente. Organische Moleküle bestehen überwiegend aus den Elementen C, H, O und N und weisen daher häufig einen positiven Massendefekt auf. Der sehr geringe negative Massendefekt von Sauerstoff (^{16}O : $-0,0050853777$ u) wird schon durch den positiven Massendefekt eines Wasserstoffatoms im Molekül überlagert und spielt deshalb eine untergeordnete Rolle. Elemente wie beispielsweise Schwefel (^{32}S : $-0,02792927$ u) und Chlor (^{35}Cl : $-0,03114729$ u) senken je nach Anzahl an vorhandenen Atomen den Massendefekt des Moleküls deutlich. Wegen der unterschiedlichen Isotope der Elemente und ihrer relativen Häufigkeit werden bei der massenspektrometrischen Detektion von organischen Molekülen im Full-Scan-Modus immer mehrere Isotopenpeaks mit einem entsprechenden Intensitätsverhältnis (Isotopenmuster) pro Molekül erhalten. Vor allem Moleküle mit Elementen, die mindestens zwei relativ häufig auftretende Isotope aufweisen (z. B. Chlor oder Brom), haben sehr charakteristische Isotopenmuster. Unter Berücksichtigung der exakten Molekülonenmasse, des Isotopenmusters und der Abstände zwischen den einzelnen Isotopenpeaks lässt sich für solche Moleküle ihre

Elementarzusammensetzung berechnen (vgl. Kapitel 4, Publikation II, Bild 2). Die Tabelle 2-3 gibt für die häufigsten Elemente von organischen Molekülen neben der Isotopenmasse die nominelle Masse der Isotopen sowie deren relative Häufigkeiten und Massendefekte wieder.

Tabelle 2-3: Exakte Atommasse, nominelle Masse, Molenbruch und Massendefekt von Elementen und ihren Isotopen (de Laeter et al., 2003)

Element	Isotop	Isotopenmasse [u]	Nominelle Masse	Molenbruch	Massendefekt [u]
Wasserstoff (H)	¹ H	1,0078250319(6)	1	0,999885(70)	0,0078250319
	² H	2,0141017779(6)	2	0,000115(70)	0,0141017779
Kohlenstoff (C)	¹² C	12 (per Definition)	12	0,9893(8)	0
	¹³ C	13,003354838(5)	13	0,0107(8)	0,003354838
Stickstoff (N)	¹⁴ N	14,0030740074(18)	14	0,99636(20)	0,0030740074
	¹⁵ N	15,000108973(12)	15	0,00364(20)	0,000108973
Sauerstoff (O)	¹⁶ O	15,9949146223(25)	16	0,99757(16)	-0,0050853777
	¹⁷ O	16,99913150(22)	17	0,00038(1)	-0,0008685
	¹⁸ O	17,9991604(9)	18	0,00205(14)	-0,0008396
Schwefel (S)	³² S	31,97207073(15)	32	0,9499(26)	-0,02792927
	³³ S	32,97145854(15)	33	0,0075(2)	-0,02854146
	³⁴ S	33,96786687(14)	34	0,0425(24)	-0,03213313
	³⁶ S	35,96708088(25)	36	0,0001(1)	-0,03291912
Chlor (Cl)	³⁵ Cl	34,96885271(4)	35	0,7576(10)	-0,03114729
	³⁷ Cl	36,96590260(5)	37	0,2424(10)	-0,0340974

Ein weiterer wichtiger Begriff in der Massenspektrometrie ist die Massengenauigkeit. Sie wird als Differenz der berechneten exakten Masse und der gemessenen genauen Masse definiert und kann als absolute Abweichung (Gl. 14) in der Masseneinheit [u] oder als relative Massengenauigkeit in ppm (Gl. 15) angegeben werden (Henderson und McIndoe, 2005; Gross, 2004).

$$\Delta m_{\text{Massengenauigkeit, absolut}} = m_{\text{berechnet}} - m_{\text{gemessen}} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$\text{Massengenauigkeit (ppm)} = 10^6 * \frac{\Delta m_{\text{absolut}}}{m_{\text{gemessen}}} \quad (\text{Gl. 15})$$

Jedoch ist es nur möglich, eine höhere Massengenauigkeit zu erreichen, wenn die Signale im Massenspektrum scharf, gleichmäßig und voneinander möglichst weit getrennt sind. Für die Beschreibung der Leistungsfähigkeit eines Massenspektrometers, benachbarte Peaks trennen zu können, werden die Begriffe Auflösung (Gl. 16) und Auflösungsvermögen R (Gl. 17) eingeführt (Murray et al., 2006).

$$\Delta m_{\text{Auflösung}} = m_{\text{Peak 1}} - m_{\text{Peak 2}} \quad (\text{Gl. 16})$$

$$R_{\text{Auflösungsvermögen}} = \frac{m_{\text{Peak 1}}}{\Delta m} \quad (\text{Gl. 17})$$

Die Auflösung ist als die kleinste Differenz Δm zweier Peaks gleicher Intensität festgelegt, bei der das Tal zwischen den beiden nur einen bestimmten Teil der Peakhöhe ausmacht. Das Auflösungsvermögen entspricht dem Quotienten der Masse $m_{\text{Peak 1}}$ und der Differenz Δm der benachbarten Massen $m_{\text{Peak 1}}$ und $m_{\text{Peak 2}}$, die voneinander getrennt werden können (Murray et al., 2006). Zwei benachbarte Peaks gelten dann als ausreichend getrennt, wenn ihr Überlappungsbereich nicht mehr als 10 % der Peakhöhe entspricht (vgl. Abbildung 2-16). Hierzu muss jedoch die Peakbreite bei 5 % relativer Höhe der Massendifferenz Δm der korrespondierenden Peaks entsprechen, da sich der Beitrag der beiden Peaks zum selben Punkt auf der m/z -Achse nur dann zu 10 % aufsummiert (Gross, 2004).

Des Weiteren kann das Auflösungsvermögen für ein einzelnes Ion über die Peakhalbwertsbreite (FWHM, engl. Full Width at Half Maximum) berechnet werden (vgl. Gl. 18). Diese Definition wird gewöhnlich bei Flugzeitmassenspektrometern und Ionenfallen verwendet, da sie Massenspektren mit relativ breitauslaufenden Peakprofilen erzeugen und bei Verwendung der 5 %-Definition eine unangemessene niedrige Auflösung besitzen (Henderson und McIndoe, 2005). Im Allgemeinen wird bei Systemen mit einem Auflösungsvermögen $R > 10000$ von hochauflösenden Massenspektrometern gesprochen.

$$R_{\text{FWHM}} = \frac{m_{\text{Peak 1}}}{\Delta m_{\text{FWHM}}} \quad (\text{Gl. 18})$$

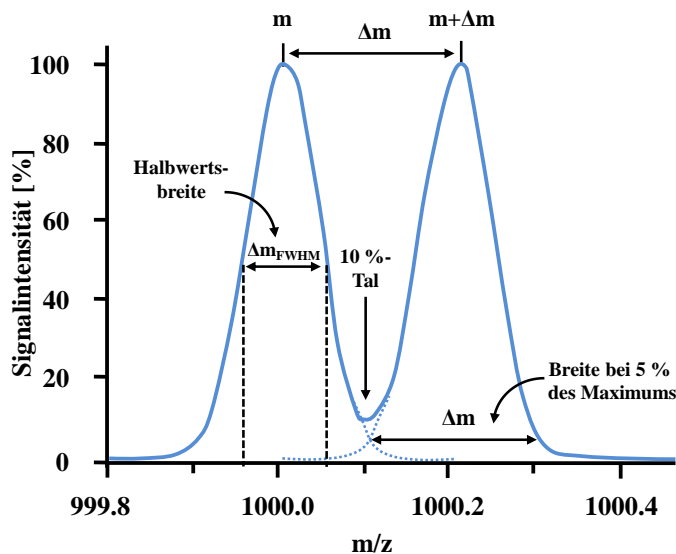


Abbildung 2-16: Graphische Darstellung der Auflösung (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)

Die von einem Massenspektrometer erzeugten Full-Scan-Massenspektren bilden die Intensitäten der detektierten m/z-Verhältnisse ab. Die Summe aller Signale eines Spektrums ergibt den Totalionenstrom. Dieser reduziert somit das zweidimensionale Spektrum auf einen Punkt. Wird der Totalionenstrom in Abhängigkeit der Zeit betrachtet, ergibt sich daraus das Totalionenstromchromatogramm (TIC, engl. total ion current chromatogram, vgl. Abbildung 2-17). Dieses ist die vereinfachte Darstellung der Analysendaten im dreidimensionalen Raum mit den Achsen m/z-Verhältnis, Intensität und Zeit. Wird nur eine bestimmte Ionenmasse bzw. ein sehr kleiner m/z-Bereich des Totalionenstromchromatogramms betrachtet, erhält man das sogenannte extrahierte Ionenstromchromatogramm (EIC, engl. extracted ion current chromatogram).

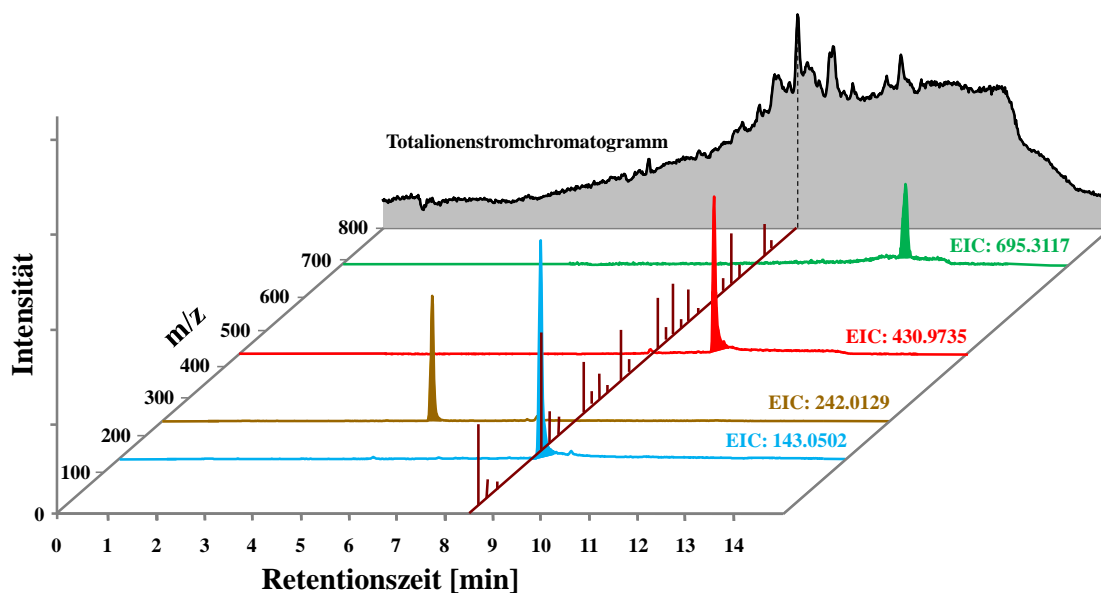


Abbildung 2-17: Schematische Darstellung eines Massenspektrums, des TIC und mehrerer EIC

2.4.3 Linearer Quadrupol-Massenspektrometer

Ein Quadrupol-Massenspektrometer besteht aus vier im Quadrat angeordneten zylindrisch oder hyperbolisch geformten Stabelektroden (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Der Abstand zwischen den einzelnen Stäben (übliche Länge von 50 - 250 mm) ist deutlich geringer als ihr Durchmesser (ca. 5 - 15 mm). Die Quadrupolstäbe müssen mit einer hohen Genauigkeit hergestellt werden und vollständig parallel ausgerichtet sein, damit ein gutes Auflösungsvermögen (maximal ca. 3000) erreicht wird (Henderson und McIndoe, 2005). Ein hyperbolischer Querschnitt der Elektroden ermöglicht eine ideale Geometrie des Quadrupolfeldes und führt dadurch zu einer optimierten Leistung des Quadrupols. Häufig werden aber angesichts der leichteren Herstellung zylindrische Quadrupolstäbe verwendet (Gross, 2004).

Die Funktionsweise des Quadrupols wurde 1953 von Paul und Steinwedel beschrieben. An den jeweils gegenüberliegenden Quadrupolstäben, die elektrisch miteinander verbunden sind, liegt sowohl eine entgegengesetzt gepolte Gleichspannung als auch eine um 180° phasenverschobene hochfrequente Wechselspannung an (Ardrey, 2003). Die Gleich- und Wechselspannungen liegen im Bereich von $10^2 - 10^3$ V und die Hochfrequenz bei 1 - 4 MHz. Ionen mit einer kinetischen Energie von ca. 10 eV unterlaufen bei der Durchquerung eines Quadrupols ungefähr 100 Oszillationen (Gross, 2004). Diese kinetische Energie der Ionen ist notwendig, da sie im Quadrupolfeld keine aktive Vorwärtsbewegung erfahren.

Die Oszillation der einzelnen Ionen wird durch die ständige Änderung der Stärke der Gleich- und Wechselspannung hervorgerufen. Je nach vorhandenem Quadrupolfeld besitzen Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses eine stabile Flugbahn (vgl. Abbildung 2-18, grün) und durchqueren den Quadrupol oder eine instabile Flugbahn (vgl. Abbildung 2-18, rot, gestrichelt) und gehen im Quadrupol verloren (Henderson und McIndoe, 2005).

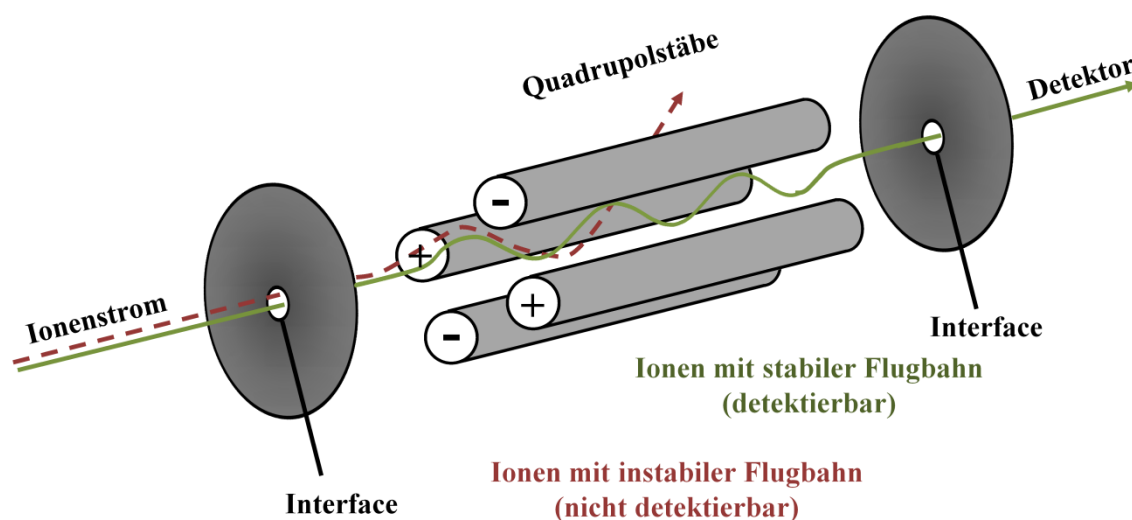


Abbildung 2-18: Schematische Darstellung eines Quadrupols (verändert nach Flanagan et al., 2007)

Die Ionenbewegung durch das elektromagnetische Feld eines Quadrupols lässt sich mit den sogenannten Mathieu-Gleichungen beschreiben und kann vereinfacht mit Gl. 19 abgeschätzt werden (Cammann, 2001):

$$\frac{m}{z} = \frac{5,7 V}{\omega^2 r^2} \quad (\text{Gl. 19})$$

- m = Ionenmasse
- r = Quadrupolradius
- V = Wechselspannung
- ω = Kreisfrequenz
- z = Ladungszahl

Das Stabilitätsdiagramm (Abbildung 2-19) gibt den Zusammenhang der Kreisfrequenz (ω), der Gleich- (U) und der hochfrequenten Wechselspannung (V) für eine stabile und nicht stabile Flugbahn von Ionen graphisch wieder. Die Parameter „a“ und „q“ sind proportional zu U/m und V/m . Um eine ausreichend hohe Auflösung mit einem Quadrupol zu erreichen, muss das a/q -Verhältnis so gewählt werden, dass die Scanlinie nahe des Hochpunkts den stabilen Bereich eines Ions durchläuft (vgl. Scanlinie A), d. h. nur Ionen in einem schmalen m/z -Bereich besitzen eine stabile Flugbahn. Durch das Absenken des a/q -Verhältnisses hingegen (Scanlinie B) wird zwar die Auflösung des Quadrupols geringer, jedoch können dadurch Ionen eines breiteren m/z -Bereiches den Quadrupol durchqueren (Henderson und McIndoe, 2005). Der Extremfall ist die Einstellung der Gleichspannung U auf null. Folglich wird für Ionen eines sehr breiten m/z -Bereichs eine stabile Flugbahn erreicht. Diese sogenannten „RF-only“-Quadrupole werden zur Ionenfokussierung und als Kollisionszellen benützt. Entsprechend betriebene Hexa- oder Octopole können auch zur Ionentransmission eingesetzt werden (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Bei der Verwendung von Quadrupolen als Kollisionszellen wird dieser mit 0.1 - 0.3 Pa Kollisionsgas (z. B. Stickstoff oder Argon) beschickt (Gross, 2004). Die in die Kollisionszelle beschleunigten Ionen stoßen mit den Kollisionsgasatomen bzw. -molekülen zusammen und zerbrechen in spezifische Fragmentionen. Diese Kollisionszellen kommen bei Tandemmassenspektrometern (Kapitel 2.4.6) zur Durchführung von MS/MS-Experimenten zum Einsatz.

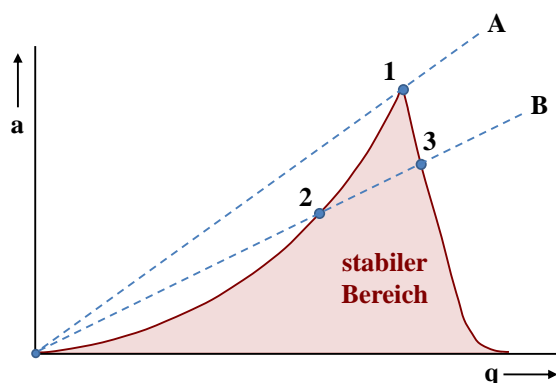


Abbildung 2-19: Stabilitätsdiagramm (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)

2.4.4 Flugzeit-Massenspektrometer

W.E. Stephens beschrieb bereits 1946 das Grundprinzip des Flugzeit-Massenspektrometers (TOF-MS, engl. time-of-flight mass spectrometer; Stephens, 1946). Die Ionen mit unterschiedlichem m/z -Verhältnis werden im TOF-MS durch einen elektrischen Impuls in Richtung des Flugrohrs beschleunigt. Während ihres Fluges durch den feldfreien Raum trennen sich die Ionen aufgrund ihrer masseabhängigen Geschwindigkeit auf (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Somit erreichen Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen nach verschiedenen Flugzeiten den Detektor. In Abbildung 2-20 ist die Massentrennung von Ionen in einem linearen TOF-MS schematisch dargestellt.

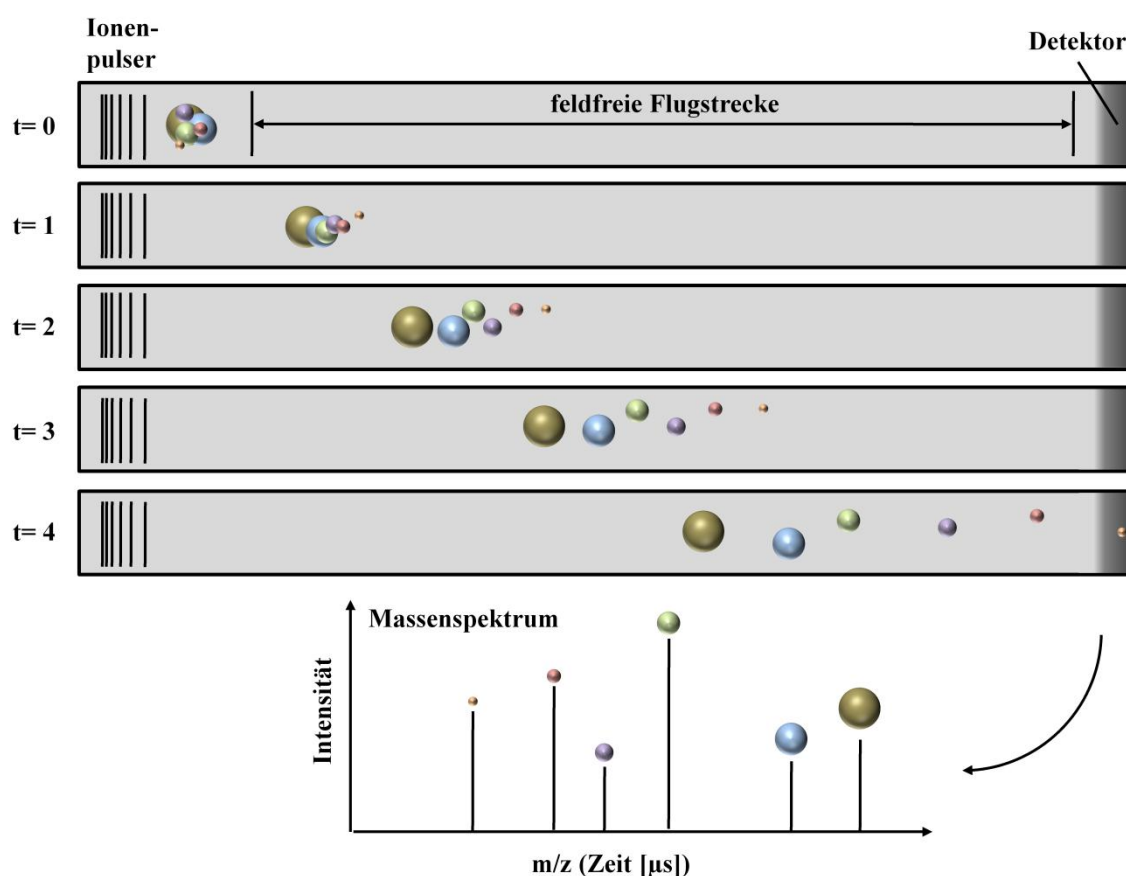


Abbildung 2-20: Schematische Darstellung der Massentrennung bei einem linearen TOF-MS (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)

Diese Technik setzte sich jedoch erst in den späten 1980er Jahren in Kombination mit der Matrix-unterstützten-Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, engl. matrix-assisted laser desorption/ionization) durch. Das TOF-MS kann im Prinzip einen unbegrenzten m/z -Bereich erfassen und von jedem einzelnen Ionisationsvorgang (z. B. pro Laserimpulse bei der MALDI) ein komplettes Massenspektrum in wenigen Mikrosekunden aufnehmen. Durch das Aufsummieren von mehreren Spektren wird das S/N deutlich gesteigert. Wegen der hohen Ionentransmission von TOF-Analysatoren besitzen sie eine relativ hohe Empfindlichkeit im Full-Scan-Modus. TOF-MS

erzeugen Spektren mit hoher Massengenauigkeit und hohem Auflösungsvermögen. Für MS/MS-Experimente kommen Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (QTOF-MS, engl. quadrupole-time-of-flight mass spectrometer Kapitel 2.4.6) zum Einsatz (Gross, 2004).

Bei einem TOF-MS wird die Flugzeit, die das Ion für die feldfreie Strecke zwischen dem Ionenpulser und dem Detektor benötigt, für die Berechnung des dazugehörigen m/z -Verhältnisses herangezogen. Hierzu wird der in Gl. 20 aufgeführte Zusammenhang genutzt.

$$E_{el} = qU = ezU = \frac{1}{2}m_i v^2 = E_{kin} \quad (\text{Gl. 20})$$

Die elektrische Ladung q eines Ions der Masse m_i entspricht der Elementarladung e und der Ladungszahl z des Ions. Durch das Anlegen einer Spannung U erfahren die Ionen eine Beschleunigung in Richtung des feldfreien Flugrohrs. Hierbei wird die elektrische Energie E_{el} in kinetische Energie E_{kin} umgewandelt (Gross, 2004). Die Geschwindigkeit v lässt sich aus dem Verhältnis der vorgegebenen feldfreien Strecke s und der dafür benötigten Flugzeit t berechnen. (Gl. 21):

$$v = \frac{s}{t} \quad (\text{Gl. 21})$$

Für die Flugzeit besteht somit folgender Zusammenhang (Gl. 22 und Gl. 23):

$$t = \frac{s}{\sqrt{\frac{2ezU}{m_i}}} \quad (\text{Gl. 22})$$

$$t^2 = \frac{m_i}{z} \left(\frac{s^2}{2eU} \right) = \frac{m_i}{z} k \quad (\text{Gl. 23})$$

Da die Faktoren s , e und U für ein System konstant (k) sind, ergibt sich für das m_i/z -Verhältnis eine Proportionalität zum Quadrat der Flugzeit. Deshalb erreichen Ionen mit geringerem m_i/z -Verhältnis den Detektor früher als Ionen mit höherem m_i/z -Verhältnis (Gross, 2004; de Hoffmann und Stroobant, 2007). Die Flugzeit von mehrfach geladenen Ionen ist entsprechend der Ladungszahl z geringer als bei einfach geladenen Ionen der gleichen Masse (vgl. Gl. 23). Mehrfach geladene Ionen lassen sich aufgrund der um $1/z$ u verringerten Abstände ihrer Isotopenpeaks relativ leicht erkennen (Gross, 2004).

Das Auflösungsvermögen R von TOF-Massenspektrometern kann durch die Beziehung zwischen m/z -Verhältnis und Flugzeit (vgl. Gl 23) hergeleitet werden (Gl. 24 und Gl. 25, de Hoffmann und Stroobant, 2007):

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eU}{s^2} \right) t^2 \quad (\text{Gl. 24})$$

$$\frac{1}{z} dm = \left(\frac{2eU}{s^2}\right) 2t dt \quad (\text{Gl. 25})$$

Werden die beiden Gl. 24 und Gl. 25 zusammengefasst, so resultiert daraus Gl. 26:

$$\frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt} \quad (\text{Gl. 26})$$

Somit kann das Auflösungsvermögen R eines TOF-MS mittels der Gl. 27 unter Berücksichtigung der Peakhalbwertsbreite Δt bzw. der Breite des beschleunigten Ionenpakets Δx berechnet werden (de Hoffmann und Stroobant, 2007):

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \approx \frac{s}{2\Delta x} \quad (\text{Gl. 27})$$

Der lineare Aufbau eines TOF-MS (vgl. Abbildung 2-20) ermöglicht eine sehr hohe Ionentransmission (ca. 90 %). Der Verlust an Ionen lässt auf deren Zusammenstöße mit noch im Flugrohr vorhandenen Gasmolekülen oder auf ihre mäßige räumliche Fokussierung durch die Ionenquelle zurückführen. Die lineare Anordnung des TOF-MS erlaubt auch die Bestimmung des richtigen m/z -Verhältnisses von metastabilen Ionen, die auf der feldfreien Flugstrecke zerfallen. Da die gebildeten Tochterionen die gleiche Geschwindigkeit wie das entsprechende Mutterion besitzen, erreichen sie den Detektor nach derselben Flugzeit (Gross, 2004). Jedoch war das mangelhafte Auflösungsvermögen vor allem bei den ersten Massenspektrometern dieser Art ein entscheidender Nachteil. Zwar kann das Auflösungsvermögen theoretisch durch Verlängerung der Flugstrecke und durch Verringerung der Beschleunigungsspannung verbessert werden, jedoch haben diese Maßnahmen einen deutlichen Empfindlichkeitsverlust zur Folge. Des Weiteren wird das Auflösungsvermögen eines TOF-MS durch die unterschiedlichen Flugzeiten von Ionen mit gleichem m/z -Verhältnis limitiert. Ursachen hierfür können beispielsweise Raumladungseffekte, die Dauer des Ionenbildungsimpulses oder verschiedene kinetische Anfangsenergie der Ionen sein (de Hoffmann und Stroobant, 2007).

Mit Entwicklung der verzögert gepulsten Extraktion (DPE, engl. delayed pulsed extraction) und des Reflektrons konnte das Auflösungsvermögen von TOF-MS deutlich verbessert werden. Bevorzugt wird die DPE in Kopplung mit der MALDI eingesetzt. Im Gegensatz zum kontinuierlichen Extraktionsmodus, bei dem dauerhaft eine Beschleunigungsspannung anliegt, können sich die Ionen bei der DPE zuerst aufgrund ihrer Anfangsgeschwindigkeiten im feldfreien Raum bewegen. Ionen mit einer höheren Geschwindigkeit bewegen sich im Vergleich zu Ionen mit geringerer Anfangsgeschwindigkeit weiter in Richtung des Detektors. Der zeitlich verzögerte Extraktionsimpuls wirkt deshalb stärker auf langsamere Ionen, die noch nicht so weit von dem Ionenpulser entfernt sind, als auf schnellere Ionen. Dadurch erreichen Ionen mit dem gleichen m/z -Verhältnis, aber unterschiedlicher anfänglicher Geschwindigkeit, in einem kleineren Zeitfenster den Detektor. Dies führt zu einer Erhöhung des Auflösungsvermögens. Jedoch sind die

optimale Impulsspannung und deren zeitliche Verzögerung von der jeweiligen Masse des Ions abhängig (de Hoffmann und Stroobant, 2007).

Eine weitere Möglichkeit, das Auflösungsvermögen zu verbessern, ist die Verwendung eines Reflektoren-TOF-MS (Abbildung 2-21). Das Reflektoren ist am Ende des Flugrohrs positioniert und besteht üblicherweise aus einer Serie von Ring- oder Gitterelektroden. An den Elektroden liegt eine Hochspannung an, die von Elektrode zu Elektrode kontinuierlich ansteigt. Das Reflektoren wird so gepolt, dass Ionen mit einer gleichartigen Ladung abgebremst und in die entgegengesetzte Richtung beschleunigt werden (Cammann, 2001). Dadurch erhöht sich die Flugstrecke der Ionen und somit das Auflösungsvermögen des Massenspektrometers ohne eine Verlängerung des Flugrohrs (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Zurzeit erreichen moderne Reflektoren-TOF-MS ein Auflösungsvermögen von bis zu $R_{\max} > 60000$ bei einer Massengenauigkeit von < 1 ppm. Außerdem kann eine Pulsverbreiterung von Ionen mit dem gleichen m/z -Verhältnis, aber mit unterschiedlicher kinetischer Energie, durch ein Reflektoren kompensiert werden (Cammann, 2001). Da Ionen mit einer höheren Geschwindigkeit tiefer in das Reflektoren eindringen, besitzen sie abhängig von ihrer anfänglichen kinetischen Energie eine längere Flugstrecke als langsamere Ionen (Henderson und McIndoe, 2005). Deshalb ist ihre Verweilzeit im Reflektoren größer und sie erreichen den Detektor schließlich gemeinsam mit den langsameren Ionen des gleichen m/z -Verhältnisses (vgl. Abbildung 2-21). Zusätzlich fokussiert das Reflektoren die Ionen in ihrer Streuung und räumlichen Verteilung (Gross, 2004).

Die Verwendung von Reflektoren-TOF-MS-Systemen hat auch einige Nachteile. Neben einem Empfindlichkeitsverlust dieser Massenspektrometer im Vergleich zu gleich dimensionierten linearen TOF-MS ist ihr Massenbereich stärker begrenzt (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Weiter können metastabile Ionen, die auf dem Weg zum Reflektoren zerfallen, nicht bestimmt werden, da die gebildeten Tochterionen das Reflektoren nicht mit der Geschwindigkeit des Mutterions verlassen.

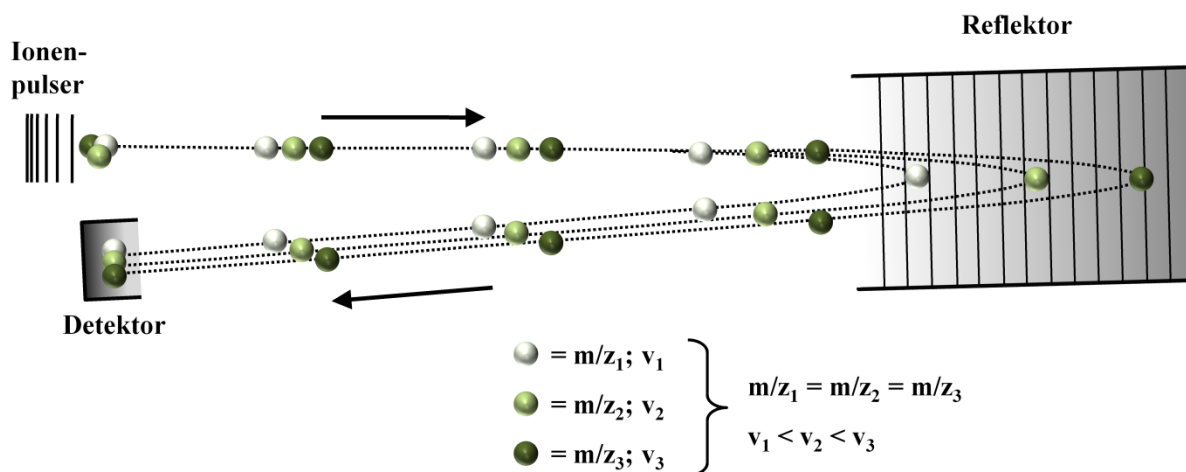


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung eines Reflektoren-TOF-MS (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)

Bei kontinuierlichen Ionenquellen, wie beispielsweise die ESI, kommen sogenannte orthogonale TOF-MS-Systeme zum Einsatz. Hierbei wird der Ionenstrahl aus der Quelle über ein gepulstes elektrisches Feld geleitet, welches die Ionen rechtwinklig zu ihrer Flugbahn in Richtung des Reflektors beschleunigt. Durch die orthogonale Ablenkung spielt die räumliche Ausbreitung des Ionenstrahls in x-Richtung vor dem elektrischen Impuls keine Rolle. Jedoch sollte die Breite des Strahls in Richtung des Flugrohrs minimal sein, damit die Entfernung der Ionen zum Ionenpulser im Prinzip identisch ist und somit auf alle Ionen die gleiche Beschleunigungsspannung wirkt. Durch diese Anordnung wird auch für kontinuierliche Ionenquellen ein hohes Auflösungsvermögen erreicht. In Abbildung 2-24 ist ein orthogonales Quadrupol-TOF-MS schematisch dargestellt.

2.4.5 Detektion

Der Detektor eines MS wandelt den Ionenstrom der einzelnen m/z -Verhältnisse in einen elektrisch messbaren Strom um. Das detektierte Messsignal ist proportional zur Intensität der Ionen. Neben der Ansprechzeit und Empfindlichkeit sind der dynamische und lineare Detektionsbereich wichtige Kenngrößen von Detektoren (Cammann, 2001). Es gibt mehrere unterschiedliche Ansätze, Ionenströme zu messen. Detektoren, wie beispielsweise der Faraday Cup, registrieren direkt den Strom, der beim Aufprall des Ions auf der Detektoroberfläche erzeugt wird. Bei Sekundärelektronenvervielfacher (SEV, engl. secondary electron multiplier) werden hingegen durch das Auftreffen der Ionen auf die Konversionsdynode Sekundärelektronen erzeugt und mit Hilfe einer Kaskade aus weiteren diskreten Dynoden oder einer kontinuierlichen Dynode verstärkt. Die Signalverstärkung von SEV-Detektoren liegt bei einem Faktor von 10^6 bis 10^8 (Henderson und McIndoe, 2005). Der erreichte Faktor hängt jedoch stark von der Aufprallgeschwindigkeit des Ions ab. Deshalb setzen große Ionen aufgrund ihrer geringeren Geschwindigkeit weniger Sekundärelektronen frei als kleinere Ionen, d. h. die Detektoreffizienz nimmt mit steigender Masse ab (de Hoffmann und Stroobant, 2007).

Die Abbildung 2-22 zeigt den Vorgang der Signalverstärkung für einen diskreten SEV-Detektor schematisch. Diese Detektoren besitzen außerdem eine kurze Ansprechzeit und sind somit für Massenanalysatoren mit einer hohen Scanrate geeignet (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Nachteile dieser Detektoren sind ihre begrenzte Lebensdauer, der relativ hohe Preis und der benötigte geringe Gaspartialdruck von maximal 10^{-4} Pa (Cammann, 2001).

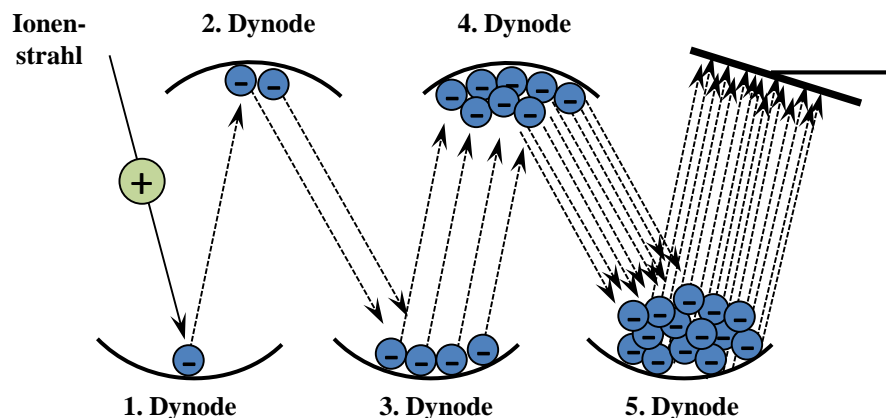


Abbildung 2-22: Schematische Darstellung eines diskreten Elektronenvervielfachers (verändert nach de Hoffmann und Stroobant, 2007)

Bei einem Scintillator-Detektor hingegen werden die Sekundärelektronen der Konversionsdynode z. B. auf eine Phosphor-Dynode beschleunigt, welche Photonen emittiert. Eine Photomultiplier-Röhre erhöht das Signal, das anschließend in einen elektrischen Strom umgewandelt wird (Abbildung 2-23, B und C, Henderson und McIndoe, 2005).

Neben den Detektoren, bei denen die Ankunft der Ionen mit unterschiedlicher Masse an einem Punkt sequenziell registriert wird, gibt es sogenannte Array-Detektoren. Diese können das Auftreffen der Ionen unterschiedlicher Masse auf der gesamten Detektoroberfläche simultan erfassen. Der Mikrokanalplatten-Detektor (MCP, engl. micro-channel plate) stellt einen wichtigen Vertreter dieser Gruppe dar und besteht aus einer Halbleiterplatte mit mehreren parallel nebeneinander angeordneten, zylindrischen Dynoden (Abbildung 2-23, A). Die Signalverstärkung liegt für einen MCP-Detektor im Bereich von 10^2 - 10^4 und ist somit deutlich geringer als bei einem SEV-Detektor. Durch die Kombination mehrerer MCP-Einheiten können jedoch Signalverstärkungen von bis zu 10^8 erreicht werden. Wegen der kurzen Wegstrecke der Sekundärelektronen in der MCP besitzen diese Detektoren eine sehr schnelle Ansprechzeit. Außerdem können Array-Detektoren breite Ionenstrahlen ohne vorhergehende Fokussierung detektieren. Sie sind deshalb besonders gut für TOF-MS-Systeme geeignet. Nachteile dieser Detektoren sind ihre Zerbrechlichkeit, ihre Luftempfindlichkeit sowie ihr verhältnismäßig hoher Preis (de Hoffmann und Stroobant, 2007; Gross, 2004; Wiza, 1979).

Die Abbildung 2-23 zeigt den Aufbau eines elektrooptischen Detektors. Hierbei werden die in dem MCP erzeugten Elektronen auf einen Scintillator beschleunigt, welcher die Elektronen in Photonen umwandelt. Im Photomultiplier wird das Signal nochmals verstärkt und anschließend detektiert (Wiza, 1979). Die elektrooptischen Detektoren besitzen eine kurze Ansprechzeit und eine vergleichbare Empfindlichkeit wie konventionelle Elektronenvervielfacher, jedoch ist ihre Lebenserwartung deutlich höher (de Hoffmann und Stroobant, 2007).

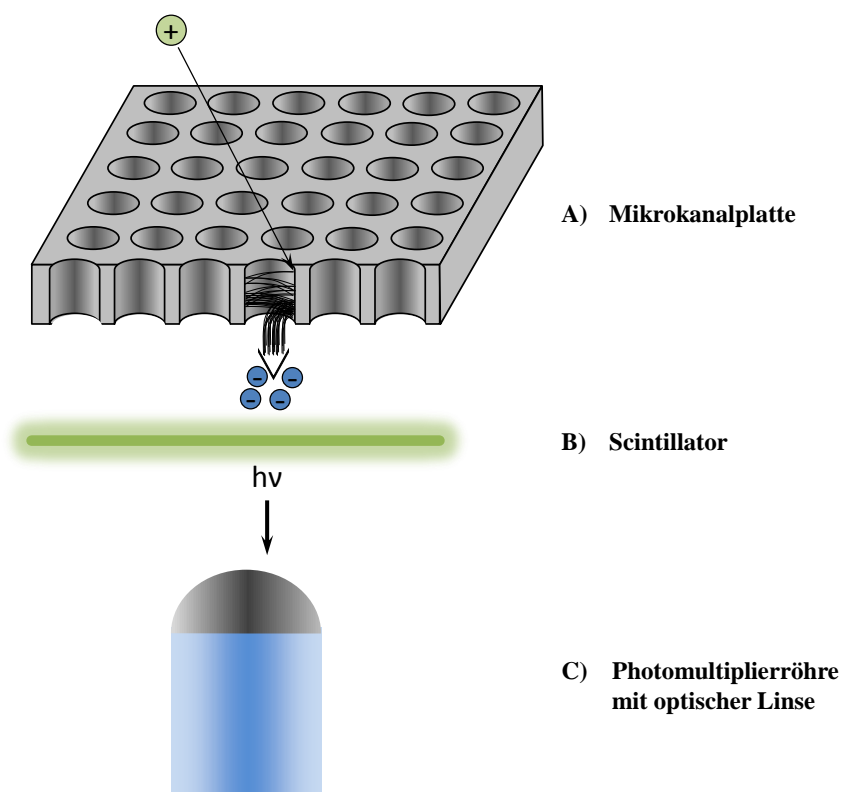


Abbildung 2-23: Schematische Darstellung eines elektrooptischen Detektors (verändert nach Agilent, 2009)

2.4.6 Tandem-Massenspektrometer

Die Tandem-Massenspektrometrie ermöglicht die Aufnahme von Fragmentmassenspektren durch die räumliche Kopplung mehrerer Massenanalysatoren. Zu den wichtigsten Vertretern gehören das Triple-Quadrupol- (QQQ-MS) und das Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometer (QTOF-MS) mit orthogonaler Beschleunigung. Im QQQ-MS (Abbildung 2-24) sind zwei Quadrupol-Massenanalysatoren (Q1 und Q3) durch eine Kollisionszelle (Q2) getrennt. Bei der Kollisionszelle handelt es sich um einen im „RF-only“-Modus (siehe Kapitel 2.4.3) betriebenen Quadrupol bzw. Hexapol, welcher geringe Mengen eines Stoßgases (z. B. Argon oder Stickstoff) enthält (Henderson und McIndoe, 2005). Stoßen die beschleunigten Analytione mit den vorhandenen Gasatomen bzw. -molekülen zusammen, brechen die Ionen in charakteristische Fragmente auseinander. Die wichtigsten Betriebsweisen eines QQQ-MS sind der Produktionenscan, der Precursorionenscan und der Neutral-Loss-Scan sowie der MRM-Modus (Multiple reaction monitoring).

Bei dem Produktionenscan ist der Q1 so eingestellt, dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses die Kollisionszelle erreichen und dort fragmentiert werden. Im dritten Massenanalysator (Q3) wird über einen bestimmten Massenbereich gescannt. Dadurch werden alle ge-

bildeten Fragmentionen detektiert und in einem entsprechenden Massenspektrum abgebildet (Henderson und McIndoe, 2005).

Die Betriebsweisen der Quadrupole Q1 und Q3 sind beim Precursorionenscan im Vergleich zum Produktionenscan vertauscht. Der Massenscan erfolgt nun im Q1 und im Q3 wird ein Fragmention mit einem bestimmten m/z -Verhältnis herausgefiltert. Durch diesen Modus können besonders gut Komponenten einer Substanzklasse, die aufgrund ihrer Grundstruktur und vorhandenen funktionellen Gruppen das gleiche Fragmention bilden, detektiert werden (Henderson und McIndoe, 2005).

Für den Neutral-Loss-Scan werden die Quadrupole Q1 und Q3 parallel mit einer konstanten m/z -Differenz (Δm) im Scan-Modus betrieben. Ionen, die im Scanbereich des Q1 liegen, werden im Q2 fragmentiert. Die Fragmentionen können anschließend nur dann den Q3 durchqueren, wenn das bei der Fragmentierung abgespaltene Neutralteilchen (z. B. H_2O oder CO_2) dem voreingestellten Δm entspricht. Dieser Modus wird zur Identifizierung funktioneller Gruppen eingesetzt, besitzt jedoch eine relativ geringe Empfindlichkeit (Henderson und McIndoe, 2005).

Der MRM-Modus spielt für die Bestimmung von Spurenstoffen wegen seiner Selektivität und Nachweisstärke eine wichtige Rolle. Im MRM-Modus wird ein ausgewählter Precursor im Q1 selektiert und danach im Q2 fragmentiert. Zur Identifizierung und Quantifizierung werden charakteristische Fragmentionen des Precursors im Q3 herausgefiltert und am Detektor registriert. Diese Betriebsweise ist in Abbildung 2-24 schematisch dargestellt. Andere Messmodi von QQQ-MS-Systemen, vor allem unter Verwendung einer linearen Ionenfalle als Q3, sind ausführlich in der Literatur beschrieben (z. B. Hopfgartner et al., 2004).

Bei einem QTOF-MS ist dem Flugzeitmassenspektrometer ein Quadrupol (Q1) und eine Kollisionszelle (Q2) analog zu einem QQQ-MS vorangeschaltet (Abbildung 2-24). Während eines MS-Full-Scans werden Q1 und Q2 nur zur Ionentransmission genutzt. Alle orthogonal beschleunigten Ionen können anschließend im Flugzeitmassenspektrometer entsprechend ihres m/z -Verhältnisses getrennt und detektiert werden. Im MS/MS-Modus werden durch den Q1 Target-Precursoren herausgefiltert, welche dann in der Kollisionszelle fragmentiert werden. Alle gebildeten Fragmente werden anschließend durch das TOF-MS detektiert.

Das QTOF-MS kann somit sowohl MS- als auch MS/MS-Spektren mit hohem Auflösungsvermögen und hoher Massengenauigkeit erzeugen. Die Verwendung des Q1 im Scan-Modus und des Flugzeitmassenspektrometers als Totalionenstromdetektor ist prinzipiell auch möglich. Dies führt jedoch zu einer größeren Geschwindigkeitsverteilung der Ionen und Ausdehnung des Ionenstrahls. Dadurch verringern sich das Auflösungsvermögen und die Empfindlichkeit des Systems. Deshalb werden normalerweise Precursorionen- und Neutral-Loss-Scans nicht mit einem QTOF-MS durchgeführt (de Hoffmann und Stroobant, 2007). Ein weiterer Nachteil eines QTOF-MS ist

aufgrund der vorangeschalteten Quadrupole der deutlich geringere detektierbare Massenbereich im Vergleich zu einem TOF-MS (Henderson und McIndoe, 2005).

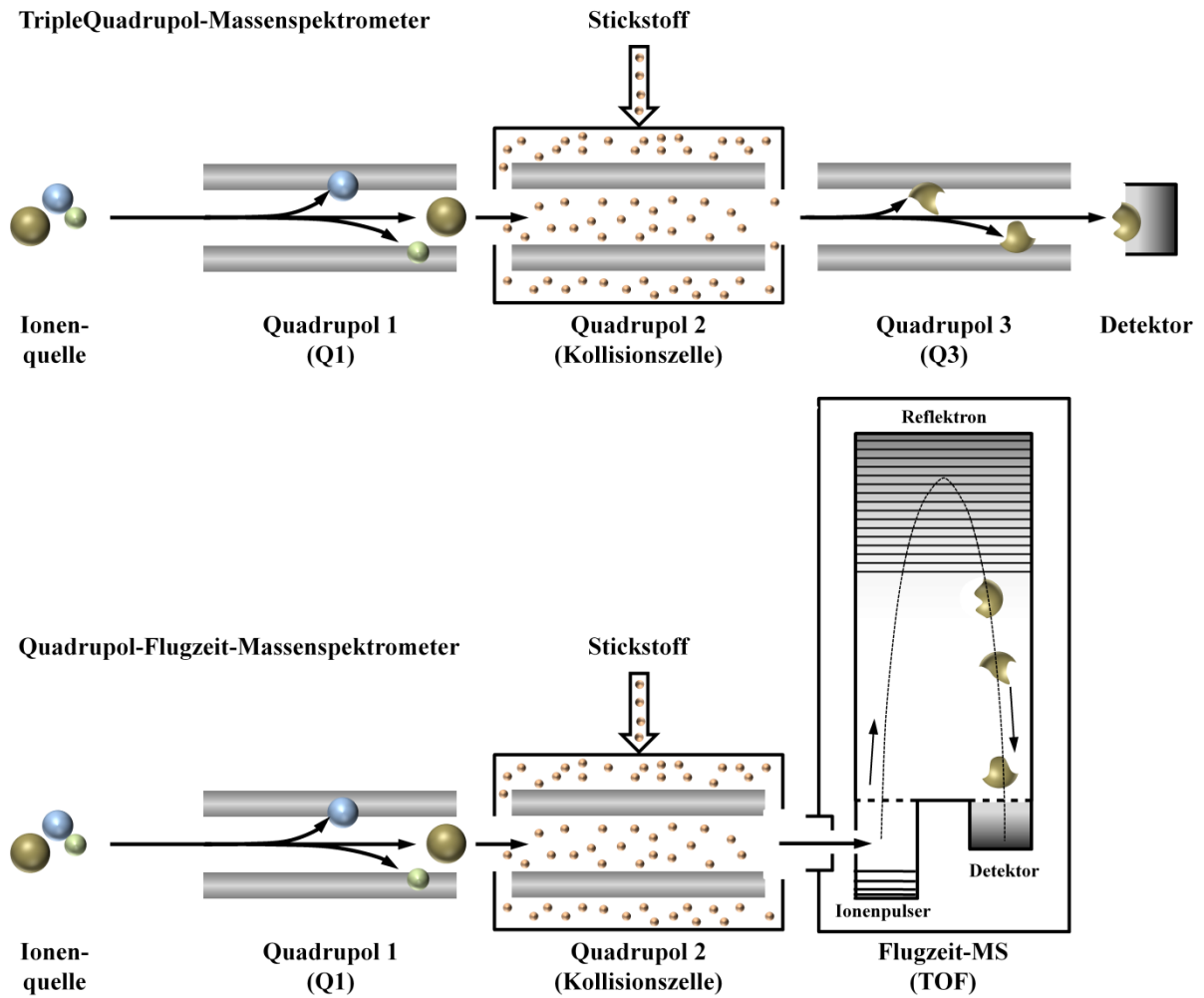


Abbildung 2-24: Schematische Darstellung eines QQQ- und QTOF-MS im MS/MS-Modus (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)

3 Publikation I

Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A New Approach to Data Evaluation in the Non-Target Screening of Organic Trace Substances in Water Analysis. *Chemosphere* 85, 1211-1219. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.009.

Copyright Elsevier. Reproduced with permission.

A New Approach to Data Evaluation in the Non-Target Screening of Organic Trace Substances in Water Analysis

Alexander Müller^{a,b}, Wolfgang Schulz^{a*}, Wolfgang K. L. Ruck^b, Walter H. Weber^a

^a *Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium,
Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau, Germany*

^b *Leuphana Universität Lüneburg, Institut für Umweltchemie, Scharnhorststr. 1,
21335 Lüneburg, Germany*

*Corresponding author:

Wolfgang Schulz

Tel.: +49 (0) 7345 96382291

Fax: +49 (0) 7345 96382290

E-mail address: Schulz.W@lw-online.de

Keywords: Non-target screening, General Unknown Screening, Transformation products, HPLC-QTOF-MS, Water purification

Abstract

Non-target screening via high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) has gained increasingly in importance for monitoring organic trace substances in water resources targeted for the production of drinking water. In this article a new approach for evaluating the data from non-target HPLC-MS screening in water is introduced and its advantages are demonstrated using the supply of drinking water as an example. The crucial difference between this and other approaches is the comparison of samples based on compounds (features) determined by their full scan data. In so doing, we take advantage of the temporal, spatial, or process-based relationships among the samples by applying the set operators, UNION, INTERSECT, and COMPLEMENT to the features of each sample. This approach regards all compounds, detectable by the used analytical method. That is the fundamental meaning of non-target screening, which includes all analytical information from the applied technique for further data evaluation. In the given example, in just one step, all detected features (1729) of a landfill leachate sample could be examined for their relevant influences on water purification respectively drinking water. This study shows that 1721 out of 1729 features were not relevant for the water purification. Only eight features could be determined in the untreated water and three of them were found in the final drinking water after ozonation. In so doing, it was possible to identify 1-adamantylamine as contamination of the landfill in the drinking water at a concentration in the range of 20 ng L^{-1} . To support the identification of relevant compounds and their transformation products, the DAIOS database (Database-Assisted Identification of Organic Substances) was used. This database concept includes some functions such as product ion search to increase the efficiency of the database query after the screening. To identify related transformation products the database function “transformation tree” was used.

1. Introduction

One of the consequences of the manifold uses of various organic substances in households, agriculture, and industry is that these can eventually end up in the aquatic environment. In addition to pesticides and their metabolites or transformation products (Sancho et al., 2006, Weber et al., 2007, Buttiglieri et al., 2009) as well as pharmaceuticals and X-ray contrast media (Mompelat et al., 2009), industrial chemicals (e.g., benzotriazoles; Giger et al., 2006, Weber et al., 2009) are the most frequently occurring, anthropogenic substances in the environment. Depending on the application of the chemicals, entry occurs directly, for example during the application of pesticides (Hogendoorn et al., 1996), or indirectly, via wastewater treatment plants (Farré et al., 2008) among others, into the environment. The aquifers can also be contaminated via refuse dumps or landfill leachates (Holm et al., 1995) as well as from accidents (Farré et al., 2008). Thus, to protect of the quality of drinking water, a constant and comprehensive monitoring of organic trace substances in the resources used for drinking water treatment is essential.

Hernández et al. (2005) divided the screening methods used for the monitoring into three different categories: (i) Pre-target screening: the particular analyte is selected before the analysis and further contaminants in the sample are not detected. (ii) Post-target screening: all compounds eluted from chromatography columns and ionized in the ion source are detected by mass spectrometry (*full scan mode*). Then post-selected analytes can be identified based on their extracted ion chromatograms (EIC). (iii) Non-target screening (a.k.a. *General Unknown Screening*): all substances accessible to the particular analysis technique are also detected; however, the focus is not on the pre- or post-target analytes, but on unexpected or unknown substances.

Today, modern screening for medium polar and polar substances is via HPLC-MS. For pre-target screening to detect organic trace substances, triple-quadrupole MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode is predominantly used, due to its selectivity and high signal-to-noise ratios (S/N) (Barceló and Petrovic, 2007; Krauss et al., 2010), which enable the quantification of target analytes without prior enrichment (direct analysis) down to the ng L^{-1} range (Seitz et al., 2006). However, the S/N of these systems sinks drastically if they are operated in scanning mode (Tolonen et al., 2009; Krauss et al., 2010). Thus, high resolution mass spectrometers, such as time-of-flight (TOF) and Fourier transform MS, are used for the post-target and non-target screening procedures because of their better S/N in scanning mode (Ibáñez et al., 2009, Tolonen et al., 2009). Here, the ion chromatograms of the individual post-target analytes are extracted from the raw data of the entire full scan spectra and then verified.

To identify unexpected or unknown compounds, full scan MS spectra must be examined by molecular feature algorithm for masses whose abundances build chromatographic and mass spectrometric peak profiles (Gómez et al., 2010). Given the exact mass, along with the isotope pattern, it is then possible to use a formula generator to compute a molecular formula of the feature (Hogenboom et al., 2009). The allocation of the molecular structure of the compound (feature) can be determined with the help of databases. Database hits are then verified by means of reference substances and MS/MS experiments. For compounds, not being identified this way, the structure elucidation is commonly done by sophisticated MS scan techniques (e.g., MS^n experiments; Liu and Hop, 2005) supplemented by derivatization reactions (Werner et al., 2008) and H/D exchange (Wolff and Laures, 2006; Liu et al., 2007) combined with information from other analysis methods (Müller et al., 2010),

The selection of those compounds recognized by non-target screening to be submitted for further identification is usually based on signal intensity (e.g., Bobeldijk et al., 2001). The signal intensity represents the product of the concentration and the ionization efficiency of the compound, which is perhaps why relevant compounds with high concentration but small ionization efficiency are often not considered. Due to the multiplicity of features that are usually

detected in most environmental samples, however, it is necessary to focus on the identification of only relevant compounds (Gómez et al., 2011).

In this work a new approach for focusing this selection on relevant features is described. Here the sample is not regarded as an isolated specimen, but rather it is evaluated in relation to a set of other samples based on considerations of e.g., their temporal, spatial, or process-related connections. (i) All detected features of the different samples are used for the following data evaluation. The detection of substances or substance groups is only limited by the applied analytical technique. That is classical meaning of non-target screening. (ii) The features of a sample are considered as mathematical sets. This enables the comparison of all features in the various samples by applying the set operators, UNION, INTERSECT, and COMPLEMENT to determine the compounds of interest. This mathematical procedure allows solving complex analytical questions. (iii) All features above a given intensity threshold are equally treated regarding their intensities during data evaluation. In contrast, for further investigation, e.g., principle component analysis (PCA), the intensities are included.

To effectively support the identification of compounds from aquatic environments, in this article the use of the DAIOS (Database-Assisted Identification of Organic Substances) database is introduced. Finally, the possibilities of this new approach are demonstrated using the example of the influence of contaminated groundwater on a drinking water supply.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

Acetone, methanol, *n*-hexane, concentrated sulfuric acid (96-97%), formic acid (purity >98%), ammonium acetate (purity >98%), and hyper-grade methanol for HPLC-MS analysis were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). HPLC water was prepared from deionised water using a Millipore Milli-Q system (Billerica, MA, USA). The following reference substances were obtained from various suppliers (Sigma Aldrich, Steinheim; VWR International GmbH, Darmstadt; and Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, all from Germany): 1-adamantylamine, 2-hydroxybenzothiazole, 4-aminoantipyrine, acetylaminoantipyrine, carbamazepine, clofibrinic acid, crotamiton, dimethylaminoantipyrine, N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET), formylaminoantipyrine, phenazone, propylphenazone, sulfadiazine, and sulfamerazine.

2.2 Sampling

The samples of landfill leachates as well as ground and process waters were collected in 2-liter amber glass bottles and stored, without further additives, in the dark at 4-6 °C.

2.3 Sample preparation (solid phase extraction)

Solid phase extraction (SPE) of the water samples was carried out on resin-based sorbent Isolute ENV + cartridges (200 mg, Biotage AB, Uppsala, Sweden) at pH 7 and pH 3; pH was adjusted by the addition of a 1:4 dilution of sulfuric acid. The Isolute ENV + cartridge was preconditioned with successive additions of 6 mL each, n-hexane, acetone, methanol, and HPLC water (pH 7 or pH 3). Subsequently, a liter of the sample was applied via a peristaltic pump at a constant flow of approximately 3 mL min⁻¹. After air-drying the resin for 30 min, the sample was eluted with a total of 6 mL methanol in 1 mL aliquots. The eluate was concentrated to near dryness with 50 °C nitrogen, taken up in 1 mL methanol, and filtered over a cellulose acetate membrane filter (0.2 µm, Restek GmbH, Bad Homburg, Germany). A sample blank for background was generated by processing a liter of HPLC water through the same procedure as for the samples. Additionally, the conditioned solid phase was immediately eluted with methanol to differentiate sample blank and solid phase cartridge blank. Methanolic extracts were stored in the dark at 4-6 °C.

2.4 HPLC-QTOF-MS analysis

The extracts were analyzed via high performance liquid chromatography, quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS). The HPLC (1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisted of a degassing unit (G1322A), a binary pump (G1312A), an autosampler (G1313A), and a thermostated column compartment (G1316A). A reversed-phase column with a flow rate of 0.6 mL min⁻¹ was used for chromatography (Zorbax Eclipse XDB-C18, 1.8 µm, 4.6 × 50 mm). As ionization modifiers, both eluents, HPLC water (A) and methanol (B), contained 0.1% (v/v) formic acid in the positive electrospray ionization (ESI+) mode and 5 mM ammonium acetate in the negative (ESI-) mode. The gradient was as follows: 1 min isocratic with 10% B in A, an 8 min linear increase to 90% B, 5 min isocratic with 90% B, and 5 min equilibration with 10% B. The injection volume was 10 µL. QTOF-MS (Accurate-Mass 6520 QTOF, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was conducted with the settings shown in Supplementary Information (11.3.1, Table S1). The stability of the system was examined by periodic analysis of an external reference standard (Rhodamine B, ESI+). The standard deviation of Rhodamine B (N = 5 over a run time of 10 h) was for the retention time < 0.1% and for the peak area about 1%. The mass accuracy of the system was better than 1 ppm.

2.5 Software and databases

Analyses were conducted using the Qualitative Analysis tools of the MassHunter Workstation Software (version B.03.01, Build 3.1.346.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with, among others, the software tools Molecular Formula Generator (MFG) and Molecular Feature Extractor (MFE). The following settings were used with the MFE for feature detection: mass range m/z 50-1000, retention time range = 2-17 min, peak height >1000 counts. Statistical

analyses were conducted using the Mass Profiler Professional software (MPP, Version 2.0, Build 99934, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

In addition to DAIOS (<http://www.daios-online.com>), we also accessed the METLIN Personal Metabolite Database Software (Version B.02.00, Build 27.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), MassBanks (<http://www.massbank.jp>), Metlin (<http://metlin.scripps.edu/>), und Chemspider (<http://www.chemspider.com/>) databases. For reactions we used the University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Pathway Prediction Database (UM-PPD; <http://umbbd.msi.umn.edu/predict/>).

3. New approach to data evaluation

Figure 1 schematically illustrates our new approach to non-target screening of samples from the aquatic environment. The three individual steps of this approach, screening, identification, and verification of transformation products (TP) are illustrated and will be described in more detail.

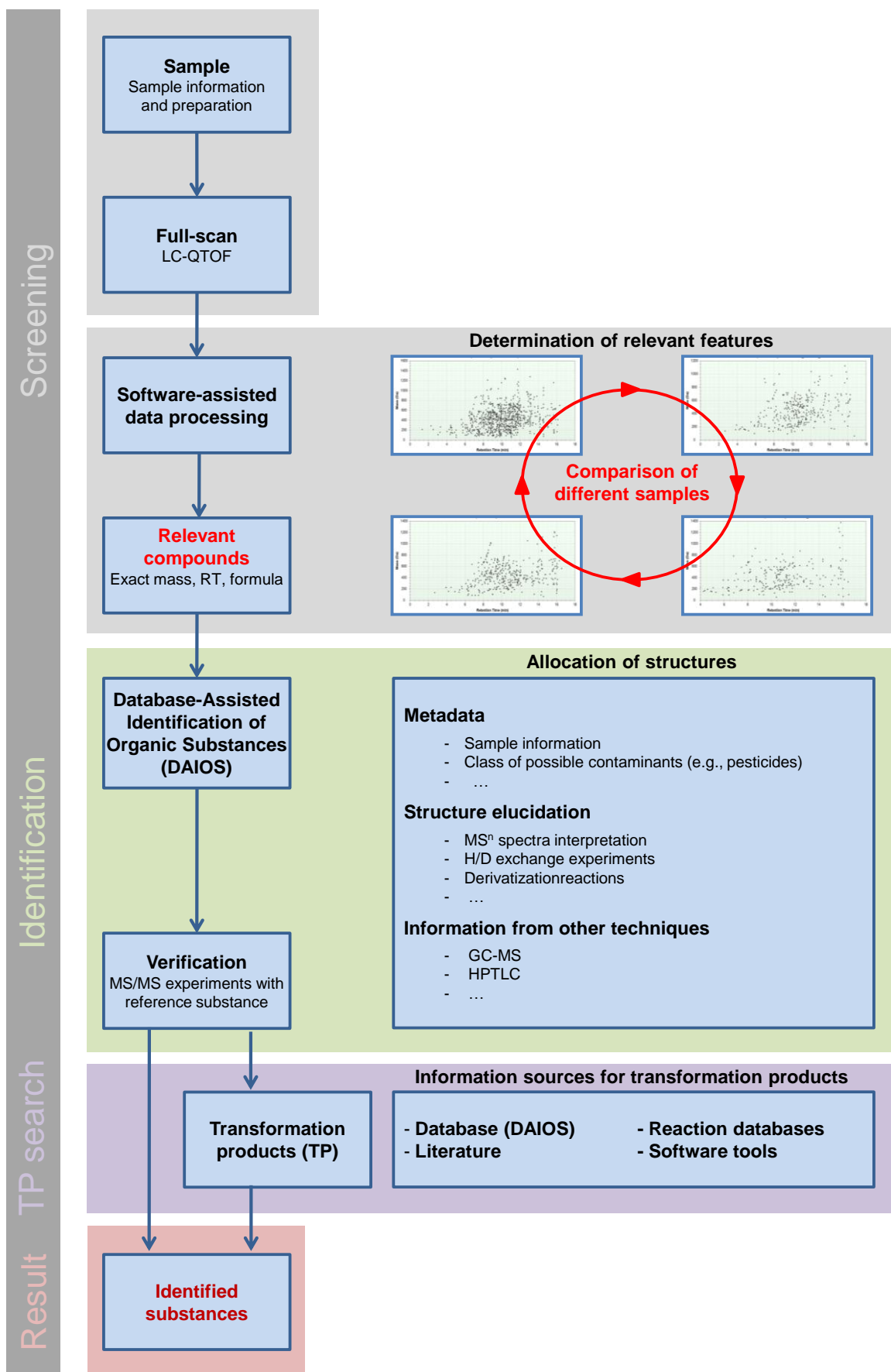


Figure 1: New approach for non-target screening

3.1 Screening and software-assisted data evaluation processing

Under this approach, data evaluation is based on the high resolution HPLC-MS full scan of a given sample. With the help of suitable software, the masses of the features are computed from the raw data set; depending on the software used, different algorithms can be employed (Katajamaa and Orešič, 2005). Features are independent of the charge of the molecular adducts and exhibit, within a certain retention time range, a time-dependent abundance distribution, such as a chromatographic elution profile. Different features can be identified as isotopes and as further molecular adducts depending on the respective algorithms and selected software settings. As a consequence a single feature/compound can include different isotope and adduct ion mass peaks. For a given data set, the numbers and kinds of features returned are determined by the selected software parameters such as signal height.

The crucial difference in data evaluation between this approach and past approaches described in the literature (e.g., García-Reyes et al., 2007) is evident in Figure 1. Each sample is characterized by its features, as represented in a mass vs. retention time scatter plot (see Figure 2). These plots represent all of the organic trace substances in the sample that can be recognized using the selected sample preparation, measuring technique (ionization and detection technology), and software. The crucial novel aspect of this approach consists of regarding the mass vs. retention time scatter plots not individually for each sample, but by comparing different, but generically related, samples.

It should be noted here that the feature detection results might contain, depending on the software, a non-negligible proportion of false positive features. These do not show chromatographic elution profiles for the molecular adduct ion in the corresponding EIC. In this case it is possible to reduce the number of false positive compounds by a statistical evaluation of multiple measurements of the sample (e.g., with MPP). A feature is then considered confirmed if it occurs in all measurements, but a final additional visual control of the EIC is also recommended. Features with signal intensities within the saturation range of the detector should be regarded separately. The use of normalization leads to problems for signals in the saturation region; however, when comparing the abundance of a given feature from different measurement series, a suitable standardization is essential.

As described above, the blank also undergoes feature detection and checking (section 2.3). The number of detected features varies from only a few up to hundreds depending on the applied SPE methods and peak detection settings. To correct for the background of the samples, matching features (with the same retention time and exact mass) in the sample and blank, without consideration of their abundance, are removed from the respective mass vs. retention time scatter plot (see Supplementary Information, 11.3.1, Figure S 1). These scatter plots are then regarded as sets (A and B) whose elements are these features. Interactions between these sets, such as UNION

(AUB), INTERSECTION ($A \cap B$), or COMPLEMENT ($A \setminus B$), can then be computed. These interactions enable one to illustrate the non-target screening questions for a particular set of samples. Figure 2 schematically illustrates an example of this for spatially and temporally varying samples. The intersection of all three samples in space, represented in the Venn diagram, focuses on the relevant substances, e.g. in the drinking water, that may originate from the various possible sources of contamination. The intersection of all three samples in time yields the features contributing to natural organic matter and the long-term contamination of a sampling point.

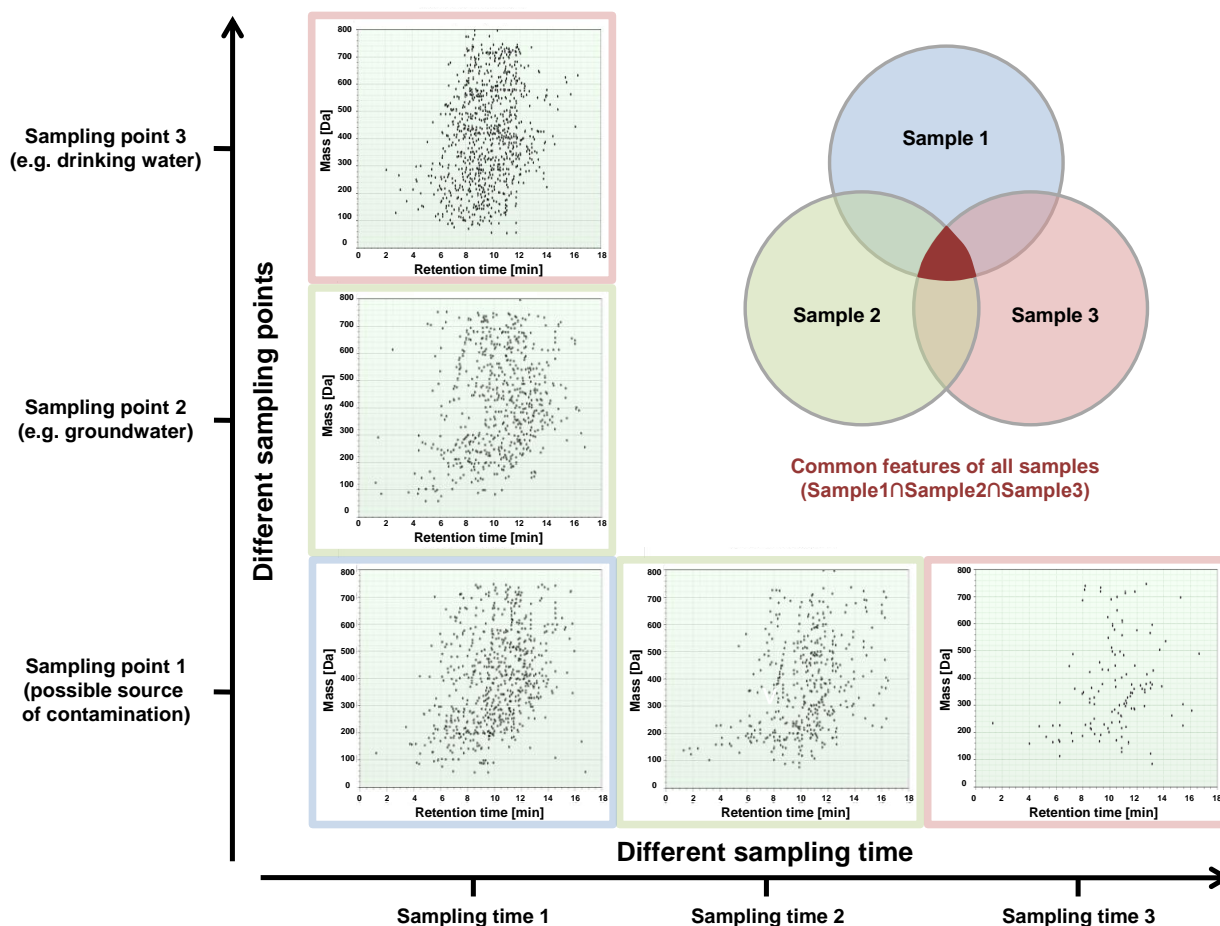


Figure 2: Venn diagram for samples with a temporal or spatial relationship

Examples of other possible questions that might be addressed by non-target screening include (i) examining the infiltration of organic substances from a waste water treatment plant into the ground water, (ii) monitoring surface waters for temporary discharges (e.g., recognizing illegal discharges), (iii) examining the effects of treatment processes (e.g., ozonation) on the removal or new formation of organic trace substances, or (iv) determining the sources (contaminated waste deposits, dumps) of groundwater contaminations. In this approach, the abundance of the individual compounds does not play a role as a selection criterion for the detection of relevant features for further analysis. However, to identify the interdependencies of relevant features in given samples it might be wise in certain cases to also consider the abundance of the components (e.g., for the determination of processing kinetics).

3.2 Database-assisted identification of organic substances

Based on the exact masses of relevant features, possible molecular formulas are calculated with the help of formula generators that take into consideration isotope spacing and isotope ratios. In addition to the common organic elements C, H, N, O, and S, strict attention must be paid to selecting other elements, for example F, Cl, I, Br, Si, and P, used for calculating the molecular formula. Many environmental contaminants include these additional elements. From experience, queries of molecular formulas in databases such as Chempider, PubChem, Metlin, or Merckindex, lead in many cases to unmanageable numbers of structural proposals for samples from the aquatic environment. The DAIOS database was designed to support the identification of organic trace substances in aqueous environmental samples. DAIOS is based on the concept of providing meaningful structural proposals from mass spectrometry data along with the use of various additional information (metadata). The numbers of structural proposals can be prioritized by the additional use of metadata, for example from known cases of damage in the surroundings of the sampling points, from existing production plants, from agricultural uses, or special urban situations.

The consideration of metadata in connection with mass spectrometry data represents the basis of the DAIOS concept, which consists of generating a database to support the identification of organic trace substances in samples from the aquatic environment. The available precursor and product ion masses, without indication of abundance, are characteristic of given molecules and serve along with variable mass accuracy (e.g., from quadrupole, TOF- and Fourier transform-MS) as primary criterion for searching the database. By forgoing spectrum comparisons, DAIOS aims to develop an instrument-independent platform for sharing data and information via the Internet. In addition to molecular data, DAIOS also incorporates additional information (e.g., about the compound's field of application or its behavior in the environment.) One special feature is the illustration of transformation trees of individual substances made possible by linking appropriate database entries with the appropriate transformation products. Literature citations with more detailed information (e.g., about findings in different water resources) will also be added to the database. These will serve as, among other things, plausibility estimations of the database hits. The results of database searches should be verified by comparisons to reference substances. If no reference substance is available, then further elucidation of the structure must be made (see *allocation of structures*, Figure 1).

3.3 Transformation products

Organic trace substances in the environment are modified, for example, by microbiological, chemical, or photochemical reactions. Information about possible TPs of known contaminants can be obtained from the literature searches as well as databases, which can compute, with the help of

known environmental reactions or technical processes (e.g., ozonation), possible TPs of the organic trace substances. For example, the Biocatalysis/Biodegradation Database Pathway Prediction System (UM-PPS, Kern et al., 2009) can be used to predict environmental TPs. In the field of pharmaceutical research, there are software tools (e.g., Metabolite ID, Agilent, Santa Clara, CA, USA) to support the identification of metabolic TPs. The use of databases to identify TPs requires links to the appropriate database entries, as now occurs in DAIOS (see section 3.2). If there is evidence for TPs in the samples, their identities must be verified by further analyses.

4. Results and discussion

Figure 3 schematically illustrates the hydrogeological conditions in the groundwater (GW) zones (2 and 3) of a drinking water supply. The task of this study was to determine the effects of a landfill (1), located in the water catchment area, on the water supply.

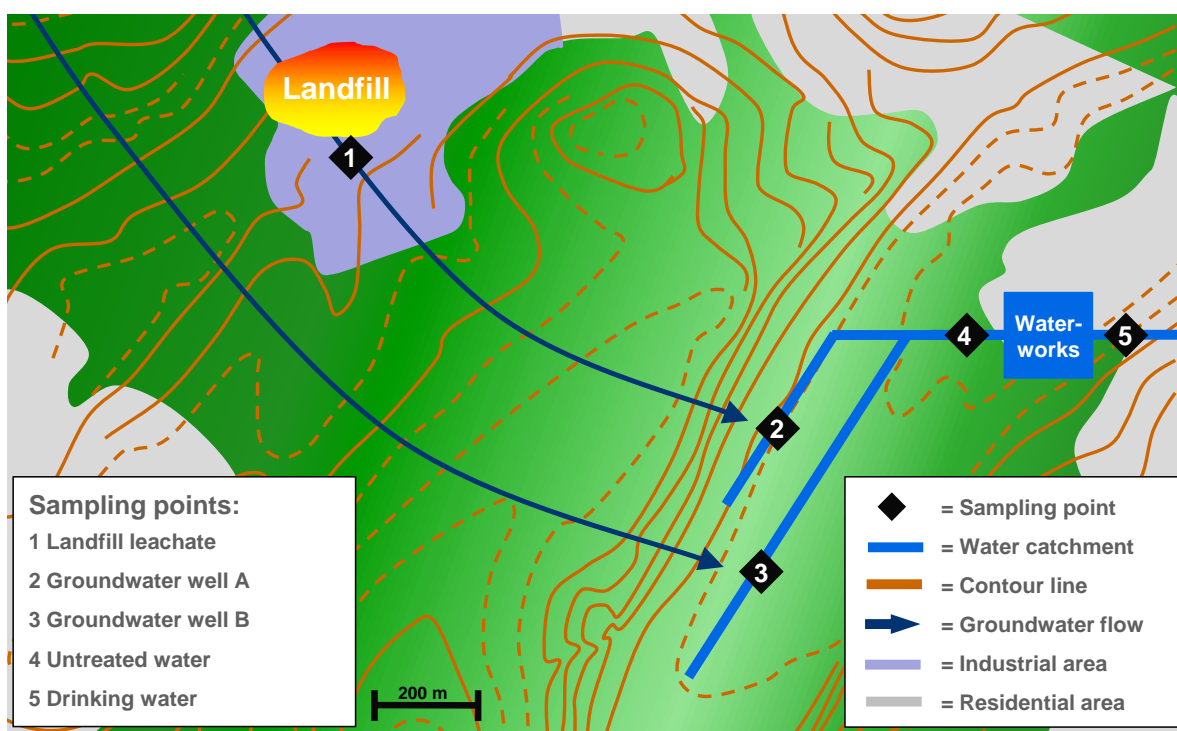


Figure 3: Schematic overview of the sampling points

Samples were collected directly from the runoff of the landfill (1), from the GW wells A (2) and B (3), the untreated water (4), and the drinking water (5). As a sampling of the water running into the landfill was not possible, groundwater well B (3) served as a background reference. SPE of the water samples and their subsequent analyses via HPLC-QTOF-MS were conducted as described in Section 2.

4.1 Case study of a screening

4.1.1 Feature detection

Feature detection in the data set analyses was conducted with the help of the MFE (Section 2.5). For the landfill leachate sample, the number of recognized features increases from 1859 to 7509 by lowering the parameter *signal height* thresholds from 10 000 to 1000 counts (see 11.3.1, Figure S2, Supplementary Information). Choice of an appropriate threshold depends on the problem being addressed. In this example a substantial dilution of the landfill leachate by the GW on its way to groundwater well A (2) had to be taken into consideration; therefore, as low a threshold (1000 counts) as possible was selected, which represents a compromise between sensitivity and analysis efficiency. The features were validated via a combination of manual checks and statistical procedures using MPP on triplet measurements of the sample. For the sake of clarity, the following evaluations considered only masses in the range of 100-300 u with retention times of 6-11 min. The tolerances selected for feature matching were <0.0030 u for the mass and <0.25 min for the retention time.

4.1.2 Determination of relevant substances

The compounds that leach out of the landfill and end up, via the groundwater, in the untreated water (waterworks-relevant compounds), were obtained by looking at the intersection of features in the landfill leachate water (1) and in the groundwater well A (2) ($LF \cap GW A$) and subtracting out those in the reference blank (groundwater well B, 3) ($LF \cap GW A \setminus GW B$), as shown in the Venn diagram in Figure 4. From the perspective of the drinking water (Figure 4), one must examine those compounds that leach out of the landfill into the untreated water and end up in the drinking water after water treatment (drinking water-relevant compounds).

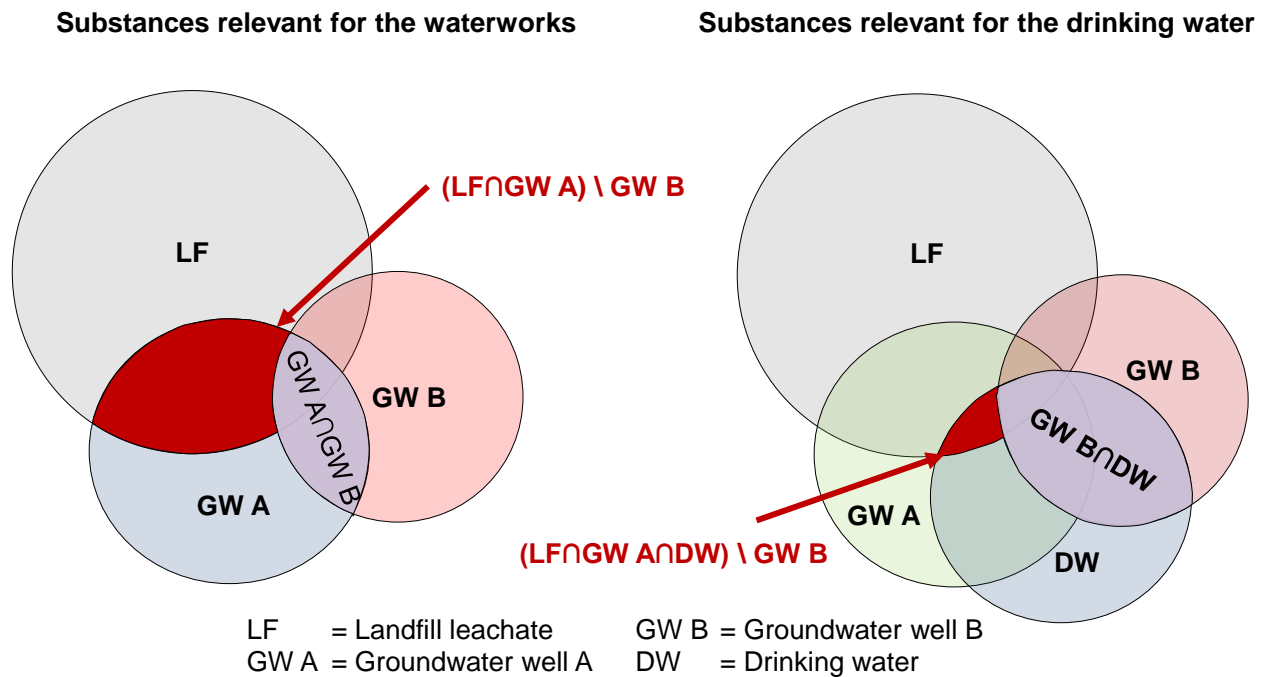


Figure 4: Venn diagrams for determining substances relevant for the waterworks and drinking water

The relevant mass vs. retention time scatter plots of features recognized in the particular samples compared in the example illustrated here (Section 4.1.1) are shown in Figure 5. The relevant features from the intersections and complements of these datasets are indicated in the plots. The analysis yielded ten water treatment-relevant features and three drinking water-relevant features. The decrease in the number of water treatment-relevant features, from 10 in groundwater well A to eight in the untreated water, can be explained by dilution of the sample via water from groundwater well B. The consequence of this dilution-induced decrease is that the threshold selected for the MFE was not exceeded; thus, it was no longer possible to detect these features. In this one-step comparative view of the five samples, all 1729 features recognized in the landfill leachate sample were examined for their relevance to treatment of the drinking water.

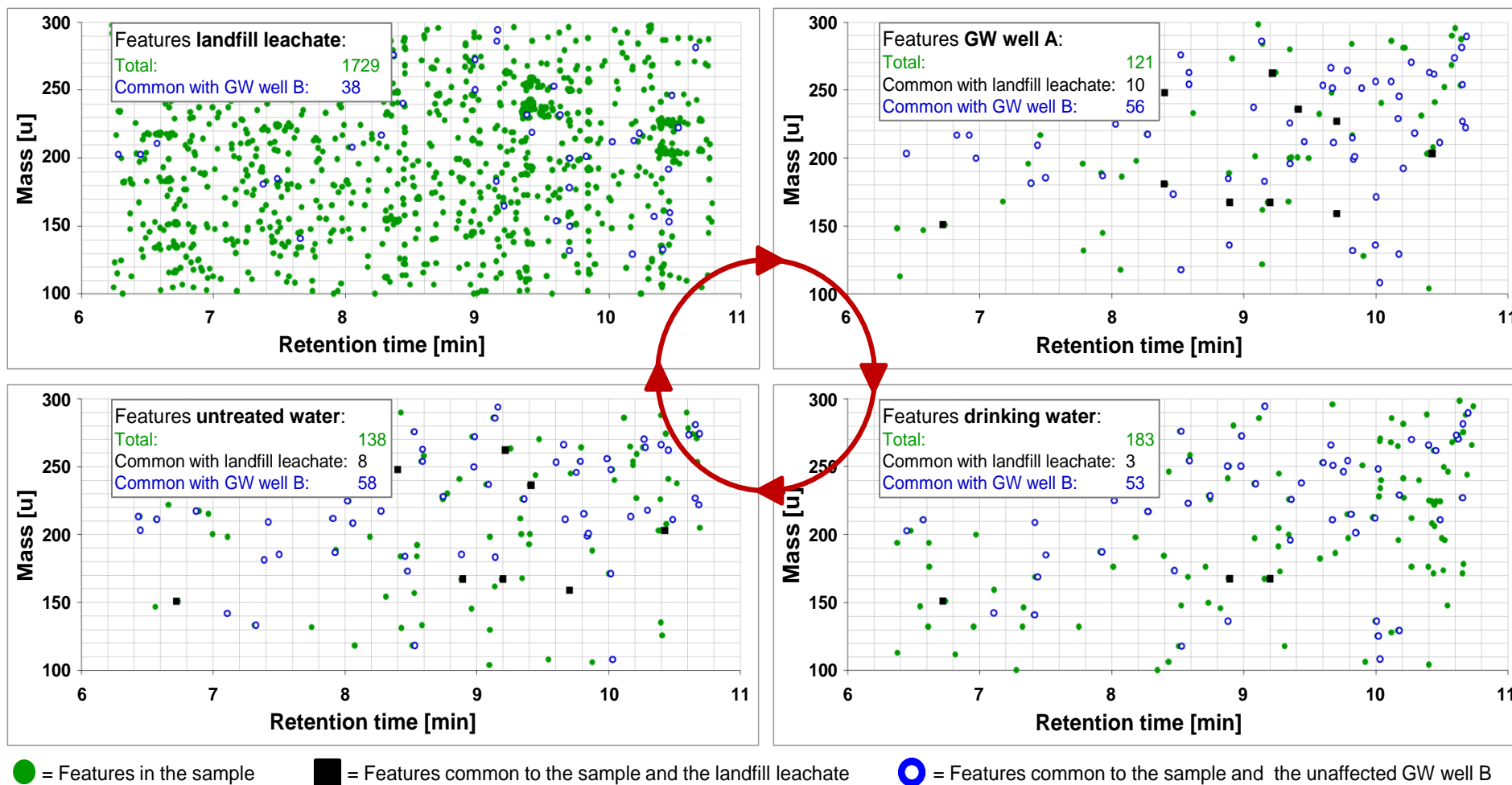


Figure 5: Features in the samples illustrated as mass vs. retention time scatter plots (blank corrected)

4.2 Identification of relevant compounds

Molecular formulas of the relevant features in this case were determined based on the elements C, H, N, O, S, and Cl using the MFG. Selection of the suggested molecular formulas relied on an absolute score determined from the combined values for the mass match, the abundance match, and the spacing match weighted in a ratio of 10:6:5 (Mueller et al., 2010).

Queries of the Pubchem und Chemspider databases yielded between 100 and over 1000 structure suggestions (not corrected for replications). Based on information concerning substances deposited in the landfill, we generated a specific database, from which three features could be assigned to possible compounds relevant to the waterworks. The compounds were identified via their MS/MS spectra and the results of hydrogen/deuterium-exchange experiments. A summary of the results for the drinking water-relevant compound 1-adamantylamine and waterworks-relevant compounds crotamiton and carbamazepine are given in the Supplementary Information (11.3.1). Results of the structure elucidations were confirmed via comparisons with reference compounds. Quantification showed that 1-adamantylamine was present at a concentration of 700 ng L⁻¹ in the landfill leachate and 20 ng L⁻¹ in the treated drinking water. In addition, 2-hydroxybenzothiazole (HOBT), phenazone, propyphenazone, dimethylaminoantipyrine (DMAA), clofibrinic acid, sulfadiazine, sulfamerazine, and N,N-diethyl-meta-toluamide (DEET), were unequivocally identified in the landfill leachate sample by means of database queries and reference substances. Finally, positive findings were cross-checked by direct target-LC-MS/MS analysis (Seitz et al., 2006).

4.3 Transformation products

The first degradation product of 1-adamantylamine computed by the UM-PPS database was 3-hydroxy-1-adamantylamine, whose mass of 167.1310 u agreed with that of two drinking water-relevant features with retention times of 8.9 and 9.2 min. However, its identity could not be confirmed by comparison with the reference substance. Further investigations to identify the two drinking water-relevant organic trace substances are being conducted.

Several features identified in the landfill leachate sample could be allocated to TPs of phenazone, propyphenazone, and dimethylaminoantipyrine (DMAA) using the DAIOS database along with its transformation tree. Finally, comparisons with reference substances identified formylaminoantipyrine (FAA), 4-aminoantipyrine (AA), and acetylaminoantipyrine (AAA) as TPs of DMAA. These and the other identified substances are listed in Table 1. Due to the small number of database entries, these results should be viewed only as an example; however, they do demonstrate an effective use of this type of structured database.

Table 1: Waterworks- and drinking water-relevant substances (grey highlighted) and other identified substances (sorted by mass)

Compound	Formula	LC	MS				Formula generator	MS/MS	
			RT [min]	[M]	Precursor (theor.)	Precursor (exp.)		Δ [ppm]	Score
2-Hydroxybenzothiazole (HOBT)	C ₇ H ₅ NOS	8.7	151.0092	152.0165	152.0167	1.3	98.4	109.0117; 119.0367; 124.0219	15
1-Adamantylamine	C ₁₀ H ₁₇ N	6.7	151.1361	152.1434	152.1435	0.6	98.9	67.0552; 79.0547; 93.0703; 107.0864; 135.1168; 136.1196	17
	C ₈ H ₁₇ NO ₂	9.7	159.1259	160.1332	160.1335	2.2	98.9	43.0552; 58.0660; 100.1124	17
	C ₁₀ H ₁₇ NO	8.9	167.1310	168.1383	168.1385	0.4	99.5	55.0550; 69.0710; 81.0715; 123.1162	21
	C ₁₀ H ₁₇ NO	9.2	167.1310	168.1383	168.1385	1.2	99.2	30.0343; 139.1108; 150.1301	21
	C ₁₀ H ₁₅ NO ₂	8.4	181.1103	182.1176	182.1179	2.1	98.1	86.0963; 69.0347; 58.0646	19
Phenazone	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	6.9	188.0950	189.1022	189.1022	0.1	97.4	56.0505; 77.0393; 104.0491; 118.0641; 131.0725; 147.0916; 161.1068; 174.0776	21
N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET)	C ₁₂ H ₁₇ NO	9.8	191.1310	192.1383	192.1389	3.3	96.3	44.0142; 72.0451; 97.0545; 100.0763; 119.0491; 120.0524	21
4-Aminoantipyrine (AA)	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O	6.0	203.1059	204.1131	204.1127	2.1	86.7	44.0493; 56.0503; 83.0600; 94.0658; 104.0494; 146.0616	22
Crotamiton (N-Ethyl-o-crotonotoluidide)	C ₁₃ H ₁₇ NO	10.4	203.1310	204.1383	204.1384	0.4	97.5	41.0399; 69.0345; 91.0549; 108.0811; 121.0890; 136.1121; 158.0966	22
Clofibrinic acid (ESI-)	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	8.4	214.0397	213.0324	213.0322	1.0	98.5	34.9693; 85.0297; 126.9954	23
	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	9.7	227.1521	250.1414	250.1422	3.6	96.6	132.0826; 176.1090; 190.1235; 218.1168	25
Propyphenazone	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O	9.3	230.1419	231.1492	231.1502	4.2	95.1	43.0553; 56.0504; 96.0806; 112.1122; 131.0726; 146.0938; 189.1021; 201.1021	25
Formylaminoantipyrine (FAA)	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	5.9	231.1008	232.1081	232.1086	2.3	81.6	56.0493; 77.0381; 83.0609; 94.0655; 104.0493	25
Dimethylaminoantipyrine (DMAA)	C ₁₃ H ₁₇ N ₃ O	4.7	231.1372	232.1444	232.1444	0.0	94.5	56.0505; 70.0649; 97.0764; 112.1123	25
Carbamazepine	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	9.4	236.0950	237.1022	237.1025	1.0	98.2	44.0138; 91.0553; 116.0493; 165.0698; 179.0728; 194.0963; 220.0756	24
Acetylaminoantipyrine (AAA)	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₂	6.0	245.1164	246.1237	246.1230	2.7	97.3	43.0202; 83.0607; 94.0636; 104.0496	27
	C ₁₀ H ₁₆ N ₈	8.4	248.1498	249.1571	249.1577	2.6	95.8	149.0735	24
Sulfadiazine	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	4.4	250.0524	251.0597	251.0602	2.1	93.0	92.0501; 108.0446; 156.0105	27
	C ₁₁ H ₁₈ N ₈	9.2	262.1654	263.1738	263.1727	4.0	93.8	105.0694; 119.0836; 145.0615	26
Sulfamerazine	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	5.5	264.0681	265.0753	265.0751	1.2	84.5	92.0495; 108.0450; 110.0712; 199.0962	28

5. Conclusion

Using an example from the field of drinking water treatment processing, the advantages of our new approach to data evaluation during non-target screening analysis could be demonstrated. By evaluating all of the features in a sample and using set operators to compare them among a set of samples, it was possible to quickly and effectively recognize the compounds relevant to a given problem independent of their intensities. Considering only the mass of the neutral molecule and the retention time enables to combine data sets of the positive and negative ESI mode for example. In the example presented, from a total of over 1700 features (only ESI+) present in a landfill leachate, we identified 10 waterworks- and three drinking water-relevant compounds. Among these, the structures for crotamiton, carbamazepine, and 1-adamantylamine were unequivocally verified. Also 11 further substances and degradation products could be identified in the landfill leachate sample. Moreover, we also demonstrated the particular usefulness of the DAIOS database for identifying TPs.

Use of this new approach to data evaluation in non-target screening analyses opens the possibilities of various other applications, for example in open- and groundwater monitoring, in the remediation of contaminated sites, or for monitored natural attenuation (MNA) as well as for evaluating the process steps during drinking water treatment (e.g., flocculation and ozonation), and for following the impact of extended waste water treatment (e.g., activated charcoal filtration and ozonation). It can be anticipated that the cost effectiveness, both in time and money, of this comparative approach will lead to its widespread use in many such applications in the near future.

6. References

- Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 26, 2-11.
- Bobeldijk, I., Vissers, J. P. C., Kearney, G., Major, H., van Leerdam, J.A., 2001. Screening and identification of unknown contaminants in water with liquid chromatography and quadrupole-orthogonal acceleration-time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 929, 63-74.
- Buttiglieri, G., Peschka, M., Frömel, T., Müller, J., Malpei, F., Seel, P., Knepper, T.P., 2009. Environmental occurrence and degradation of the herbicide n-chloridazon. *Water Res.*, 43, 2865-2873.

- Farré, M.I., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 27, 991-1007.
- García-Reyes, J.F., Hernando, M.D., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2007. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 26, 828-841.
- Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.P.E., 2006. Benzotriazole and Tolyltriazole as Aquatic Contaminants. 1. Input and Occurrence in Rivers and Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 40, 7186-7192.
- Gómez, M.J., Gómez-Ramos, M.M., Malato, O., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., 2010. Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *J. Chromatogr. A*, 1217, 7038-7054.
- Gómez, M.J., Herrera, S., Solé, D., García-Calvo, E., Fernández-Alba, A.R., 2011. Automatic Searching and Evaluation of Priority and Emerging Contaminants in Wastewater and River Water by Stir Bar Sorptive Extraction followed by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 83, 2638-2647.
- Hernández, F., Pozo, O.J., Sancho, J.V., López, F.J., Marín, J.M., Ibáñez, M., 2005. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. *TrAC-Trend. Anal. Chem.*, 24, 596-612.
- Hogenboom, A.C., van Leerdam, J.A., de Voogt, P., 2009. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216, 510-519.
- Hogendoorn, E.A., Hoogerbrugge, R., Baumann, R.A., Meiring, H.D., de Jong, A.P.J.M., van Zoonen, E., 1996. Screening and analysis of polar pesticides in environmental monitoring programmes by coupled-column liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 754, 49-60.
- Holm, J.V., Rügge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.*, 29, 1415-1420.

- Ibáñez, M., Guerrero, C., Sancho, J.V., Hernández, F., 2009. Screening of antibiotics in surface and wastewater samples by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216, 2529-2539.
- Katajamaa, M., Orešič, M., 2005. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics*, 6, 179.
- Kern, S., Fenner, K., Singer, H.P., Schwarzenbach, R.P., Hollender, J., 2009. Identification of Transformation Products of Organic Contaminants in Natural Waters by Computer-Aided Prediction and High-Resolution Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 43, 7039-7046.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., 2010. LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.*, 397, 943-951.
- Liu, D. Q., Hop, C. E. C. A., 2005. Strategies for characterization of drug metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with chemical derivatization and on-line H/D exchange approaches. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 37, 1-18.
- Liu, D. Q., Wu, L., Sun, M., MacGregor, P.A., 2007. On-line H/D exchange LC-MS strategy for structural elucidation of pharmaceutical impurities. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 44, 320-329.
- Mompelat, S., Le Bot, B., Thomas, O., 2009. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.*, 35, 803-814.
- Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, S., Albert, R., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 24, 659-666.
- Sancho, J.V., Pozo, Ó.J., Ibáñez, M., Hernández, F., 2006. Potential of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the determination of pesticides and transformation products in water. *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 987-997.
- Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H., 2006. Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, 20, 2281-2285.
- Tolonen, A., Turpeinen, M., Pelkonen, O., 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. *Drug Discov. Today*, 14, 120-133.

- Weber, W.H., Seitz, W., Schulz, W., 2007. Nachweis der Metaboliten Desphenyl-chloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser. *Vom Wasser*, 105, 7-14.
- Weber, W.H., Müller, A., Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2009. 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe. *Vom Wasser*, 107, 16-24.
- Werner, E., Heilier, J.-F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., Tabet, J.-C., 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *J. Chromatogr. B*, 871, 143-163.
- Wolff, J.-C., Laures, A.M.F., 2006. "On-the-fly" hydrogen/deuterium exchange liquid chromatography/mass spectrometry using a dual-sprayer atmospheric pressure ionisation source. *Rapid Commun. Mass Spectr.*, 20, 3769-3779.

4 Publikation II

Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, A., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 659-666, DOI:10.1002/rcm.4430.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Combination of different Liquid Chromatography Mass Spectrometry Technologies for the Identification of Transformation Products of Rhodamine B in Groundwater

Alexander Müller^{a,b}, Stefan C. Weiss^{a,b}, Wolfgang Schulz^{a*}, Wolfram Seitz^a,
Roger Albert^a, Wolfgang K. L. Ruck^b, Walter H. Weber^a

^a *Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium,
Am Spitzigen Berg 1, D-89129 Langenau, Germany*

^b *Leuphana Universität Lüneburg, Institut für Ökologie und Umweltchemie, Scharnhorststr. 1,
D-21335 Lüneburg, Germany*

*Corresponding author:

Wolfgang Schulz

Tel.: +49 (0) 7345 96382291

Fax: +49 (0) 7345 96382290

E-mail address: Schulz.W@lw-online.de

Keywords: Rhodamine B, screening, transformation products, nano-chip HPLC, QTOF, HPTLC

ABSTRACT

Rhodamine B and its five de-ethylated transformation products could be identified in a groundwater sample. Using high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) six fluorescent zones were detected in the sample. In order to identify the compounds in the zones by exact mass mass spectrometry (MS) measurements and tandem mass spectrometry (MS/MS), they were extracted from the HPTLC plate for subsequent analysis by nano-chip high-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (nano-chip HPLC/QTOFMS). In addition, chemical derivatisation experiments on HPTLC plates were applied to detect the presence of a primary amino group in the transformation products. From the combined analytical results it was possible to allocate rhodamine B and its five de-ethylated transformation products to the six different HPTLC zones. The quantification of rhodamine B in different groundwater samples was carried out by a high-performance liquid chromatography/ triple quadrupole mass spectrometry (HPLC/MS/MS). The maximum detected concentration of rhodamine B was $83 \mu\text{g L}^{-1}$.

INTRODUCTION

Dyes are often used as hydrological tracers to investigate water movement, especially in the subsurface. Tracing experiments are mostly carried out to assess flow pathways within the catchment area of drinking water abstraction plants.¹ Another important use of tracers is to verify pollutant dispersal and behaviour in the environment, although many other interesting applications have been described.²⁻⁴ Comprehensive overviews of hydrological tracer techniques have been given by Käss⁵ and by Leibundgut et al.⁶

The choice of a tracer to be used depends on its properties and its interaction with the surrounding environment. An ideal tracer should not occur in the environment and should show no sorption effects onto soil particles. Its movement should be similar to that of water. Furthermore, it must be stable in terms of biological degradation through microorganisms, chemical reactions, and light and temperature. It should also be detectable down to low concentrations, harmless to humans and the environment, and inexpensive.^{1,7} It appears that an ideal tracer does not exist.⁷ However, fluorescent dyes are commonly used as hydrological tracers because they best exhibit these required characteristics. Fluorescent dyes can be detected at low levels and they generally show lower sorptive properties than nonfluorescent tracers.⁵ The adsorption of the dyes onto solid surfaces has to be considered, especially for the assessment of groundwater pathways, and the sorption of tracers onto different soil media varies greatly.^{8,9}

Tracing experiments with dyes pose a potential risk of long-term contamination of the investigated aquifer. Behrens et al.¹ have made a comprehensive assessment of the toxicity and ecotoxicity of 17 water tracers, and genotoxic and/or an ecotoxic effects were confirmed for sulforhodamine B, rhodamine B and rhodamine WT. In a review by the European Food Safety Authority,¹⁰ Rhodamine B is classified as being “potentially both genotoxic and carcinogenic”. Tracer dyes are exposed to different chemical and physical conditions in the environment, and they can be decomposed by chemical, biochemical and photo degradation.⁷ In the course of a tracer experiment, Käss⁵ observed in the fluorescence spectrum a decrease in the maximum excitation for rhodamine B and an increase in a side maximum. He attributed this effect to the de-alkylation of rhodamine B in the environment. De-ethylated transformation products of rhodamine B were also observed in laboratory experiments as photocatalytic degradation products.¹¹ He et al.¹² identified the comprehensive photocatalytic degradation pathway of rhodamine B in the presence of H₂O₂ up to mineralisation. In addition to the mentioned de-ethylated transformation products, seven organic acids, such as succinic acid and benzoic acid, could be detected.

In May 2008, a red-coloured groundwater sample was taken from a monitoring well situated in karstic ground in southern Germany. The well had not shown any abnormality in the previous 30 years. The present paper describes the application of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of contaminants in this water sample. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) was used with different detection techniques (UV-VIS absorption, fluorescence, derivatisation, effect-directed analysis^{13,14}) in combination with nano-chip high-performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (nano-chip HPLC/QTOFMS) and HPLC/MS/MS. The coupling of HPTLC and HPLC/MS had already been successfully used to confirm the structures of two transformation products of the herbicide chloridazon (desphenyl-chloridazon and methyl-desphenyl-chloridazon) in different water sources.¹⁵

EXPERIMENTAL

Materials and chemicals

Standard solutions of rhodamine B, uranine and malachite green were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sulforhodamine B came from Simon und Werner (Flörsheim, Germany) and Eosin from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The structural formulae of the tracer dyes are shown in Figure 1. Formic acid (purity > 98%), hydrochloric acid (32%), hyper grade methanol for LC-MS, ammonium acetate (purity > 98%), sodium nitrite, N-[1-Naphthyl]ethylenediamine, NaCl, NaH₂PO₄·H₂O, Pepton from Casein, K₂HPO₄, Glycerol (87%), (NH₄)₂HPO₄, MgSO₄ and yeast extract were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Methanol and dichloromethane for the HPTLC came from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). HPLC water was prepared from deionised water by using a Millipore MilliQ System (Billerica, USA).

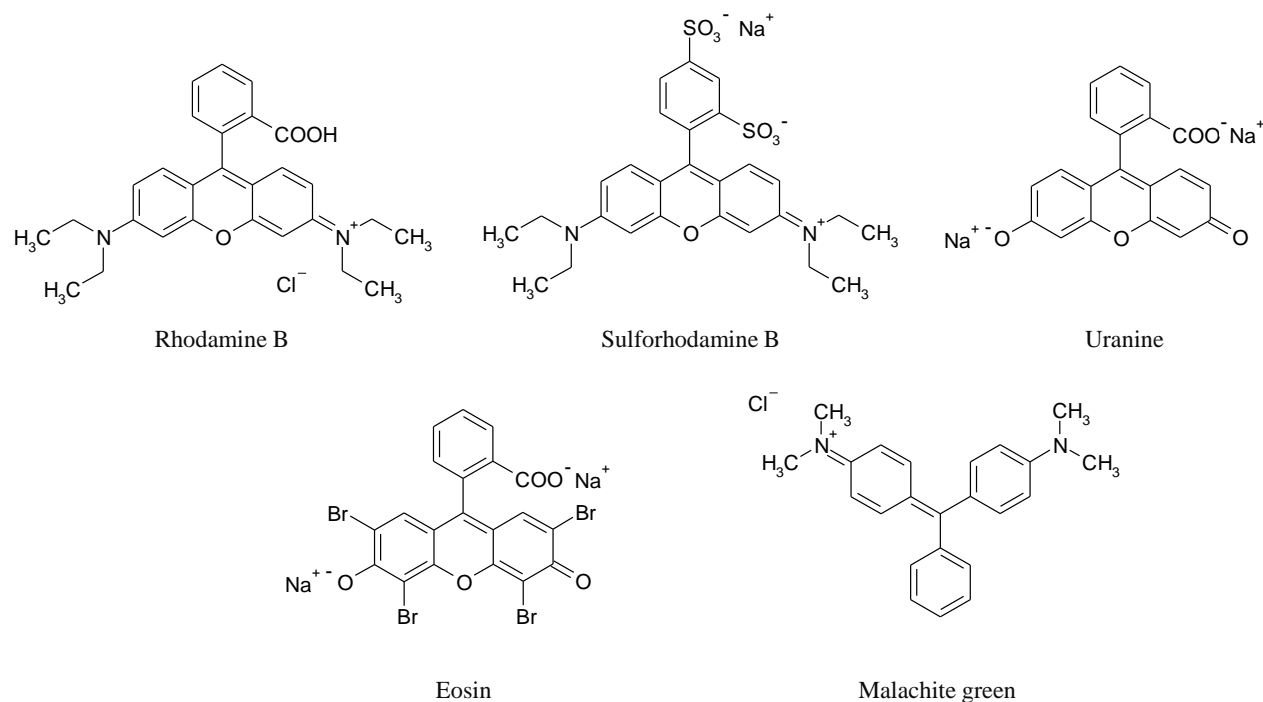


Figure 1: Structural formulae of five tracer dyes

Sample

The red-coloured groundwater sample was obtained from a monitoring well located in the east of the Swabian Alb (highlands in southern Germany). The region is characterized by karstic ground. The sample was taken in a glass bottle (1 L) and it was stored in the dark at 4°C. The following sample parameters were determined: conductivity of 401 $\mu\text{S cm}^{-1}$, pH of 8.0, spectral absorption coefficient (254 nm) of 95.81 m^{-1} (unfiltered), spectral absorption coefficient (436 nm) of 69.51 m^{-1} (unfiltered), and a water hardness of 2.20 mmol L^{-1} CaCO_3 .

Analysis

HPTLC-automated multiple development (AMD)

As stationary phase, HPTLC silica gel 60 F254 plates (LiChrospher, 200 x 100mm, Merck) were used, pre-developed with methanol and then dried at 120°C for 30 min. The aqueous samples were applied to the HPTLC plate using the ‘Automatic TLC Sampler 4’ (Camag, Muttenz, Switzerland) application sampler in zones measuring 7mm x 4mm. The chromatographic development was performed using Automated Multiple Development 2 (AMD 2, Camag). The

AMD 2 technique enables a solvent gradient to be developed which comprises several steps with different solvent mixtures. Each gradient step has a longer migration distance than the step before; this leads to narrow substance bands and a higher resolution of the separation.

The gradient used for the first analyses was methanolbased with the addition of formic acid and dichloromethane and comprised 23 steps. The drying time after each step was 2 min. The settings for the optimised gradient are shown in the Supporting Information (11.3.2). The extractions of HPTLC zones for the MS analysis were carried out with water/acetonitrile (50:50 (v/v), 5 mmol L⁻¹ ammonium acetate, a flow rate of 0.2 mL min⁻¹, and an extraction time of 1 min) using the TLC/MS interface from Camag. The extractor is designed according to the principles of Luftmann.^{16,17}

Lyophilised *Vibrio fischeri* from Dr. Lange (Düsseldorf, Germany) were prepared for the bioluminescence detection as follows. The bacteria were reactivated with the reactivation solution provided and grown in approximately 200 mL of culture media in an Erlenmeyer flask according to the procedure stated in EN ISO 11348-1L34. The media is made from ultra-pure laboratory water, NaCl, NaH₂PO₄*H₂O, peptone from casein, K₂HPO₄, glycerol, (NH₄)₂HPO₄ and yeast extract. The pH value was adjusted to 7.0 ± 0.2 with NaOH. The flask containing the culture media was then autoclaved for 20 min at 121°C.

In the first step of the bioluminescence detection, the developed plate was placed into a twin trough chamber. This chamber was filled on one side with 10% NH₃ (aq.). After a conditioning time of 5 min in the NH₃ atmosphere, the plate was placed into a vacuum for 10 min.

Subsequently, the TLC plate was automatically dipped for 2 s at a speed of 3 cm s⁻¹ into the suspension of *Vibrio fischeri* using a chromatogram immersion device III (Camag). After the immersion, the surplus suspension was uniformly removed by a wiper. The TLC plate was then positioned into a BioLuminizer (Camag) object retainer, which was covered with a glass plate to prevent the plate from drying. The images were captured using a cooled charge coupled device (CCD) camera with an exposure time of 40 s.

In order to detect primary amino groups,¹⁸ the developed HPTLC plate was exposed in a container with NO_x gases for the diazotisation reaction. In a second step, the plate was immersed in the Bratton-Marshall reagent for 3 s. Coloured zones were visible on the plate after drying (Fig. 4).

Nano-chip HPLC/QTOFMS

The liquid chromatographic separation of the extracts from the HPTLC and the original water sample was carried out with a 1200 Series nano-HPLC system (Agilent, Waldbronn, Germany), which was comprised of a capillary pump (G1376A), a nano pump (G2226A), two degasser units

(G1379B), an autosampler (G1377A) with thermostat (G1330B) and a HPLC-Chip-Cube (G4240A). Separation was performed using a HPLC-Chip (G4240-65001) with an enrichment column (40 nL, 4 mm length) and an analytical column (160 nL, 75 x 50 μm , 43 mm length). The stationary phase consisted of Zorbax 80SB-C18 (5 μm). The sample was filtered through a 0.45 μm cellulose filter before analysis. The sample injection (injection volume: 1 - 8 μL) and enrichment were run at flow rates of 4 $\mu\text{L min}^{-1}$ (100% deionised water without additives) on the enrichment column. The analytical flow rate was 0.4 $\mu\text{L min}^{-1}$ and the gradient was composed of water (A) and acetonitrile with 5% (v/v) water (B); 0.1% (v/v) formic acid was added to both eluents. The gradient comprised: 1 min isocratic elution with 5% B, in 7 min from 5% to 90% B, 2 min flushing at 90% B and equilibration for 5 min at 5% B. The settings for positive electrospray ionization (ESI) mode were: flow rate of the drying gas (nitrogen) of 5 L min^{-1} and drying temperature of 320°C. The nano-HPLC system was coupled with a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer (6520 QTOF, Agilent). The MS parameters are given in Table 1. Nano-chip HPLC was used to increase the sensitivity of the LC/MS system. The higher sensitivity enables the detection of lower concentrations of contaminants without an enrichment step.

Table 1: Settings of the QTOF mass spectrometer

Capillary voltage	~ 1850 V
Fragmentor voltage	200 V
Skimmer voltage	65 V
Mode	MS-only and MS/MS
Scan range	50 - 1000 m/z
Scan rate	MS: 1 spectrum s^{-1} MS/MS: 3 spectra s^{-1}
Reference masses	121.0508 m/z 922.0097 m/z

The analysis data set was evaluated by using the Agilent MassHunter Qualitative Analysis software (version B.02.00, build 2.0.192.0) including an empirical formula generator tool. An absolute score was given for every proposed formula. The absolute score can vary from 0 to 100 (optimum) and comprises the mass, abundance and spacing matches (Fig. 2). The following chemical elements were allowed for generating the formulae: C, H, N, O, S, Cl.

The limit of detection (LOD) according to DIN 3264519 was determined to be 14 ng L^{-1} for rhodamine B and the limit of quantification (LOQ) to be 32 ng L^{-1} (injection volume: 8 μL).

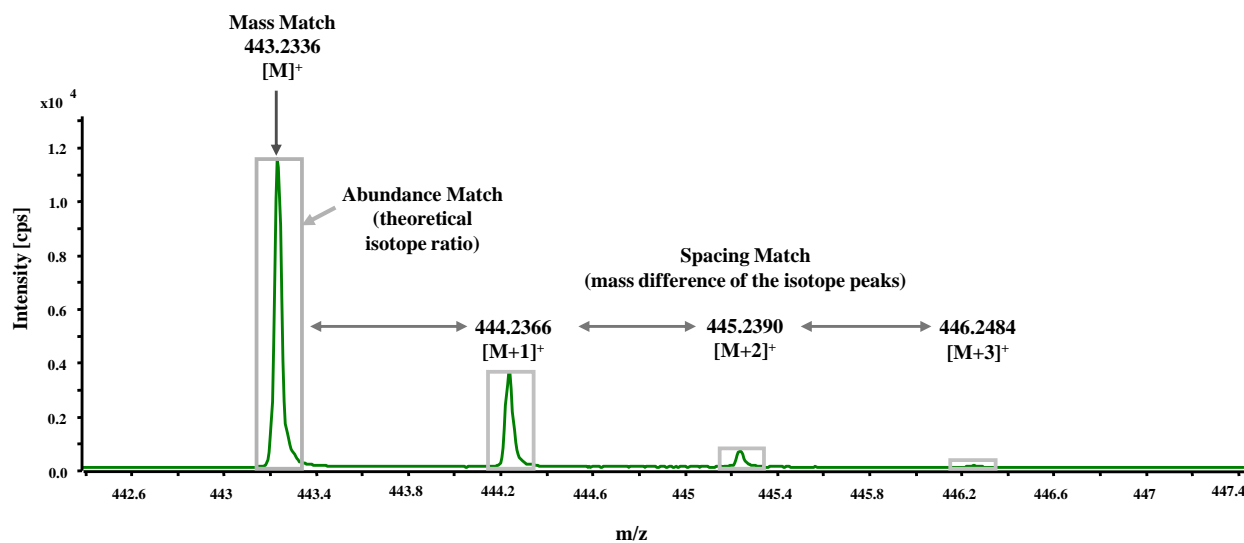


Figure 2: MS spectra of rhodamine B

HPLC-MS/MS/MS

The liquid chromatography system (Agilent 1100 Series) consisted of a degasser unit (G1379A), binary pump (G1312A), autosampler (G1313A) and column oven (G1316A). The LC column was an Agilent Zorbax Eclipse XDB (50 x 4.6 mm, 1.8 μm). The eluents were prepared from deionised water (A) and methanol (B) with addition of 0.1% (v/v) formic acid. A volume of 100 μL of the filtered sample (0.45 μm) was injected. A flow rate of 0.6 mL min^{-1} was used for the analysis. The gradient started with 20% B, increased to 80% B in 5 min, after 3 min flushing using 80% B; equilibration of the column was carried out at 20% B in 7 min.

The API 4000 triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) set in the positive ionisation mode was applied for the quantitative analysis. The following ESI-MS settings were used: spray gas pressure 65 psi, drying gas pressure 60 psi, drying temperature 550°C, activated interface heater, ion spray voltage -4500 V and curtain gas pressure 25 psi. The mass transitions used for rhodamine B are listed in Table 2. The retention time was 7.2 min. The calibration for the red-coloured water sample ranged from 0.5 to 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ and it was diluted by a factor of 100. The LOD for rhodamine B was 0.2 ng L^{-1} and the LOQ was 1.0 ng L^{-1} .

Table 2: Settings of the Triple Quadrupole mass spectrometer

Compound	RT (min)	Q1 [M] ⁺ (m/z)	Q3 (m/z)	Time (ms)	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)
Rhodamine B	7.2	443.3	282.1	100	91	111	40
		443.3	341.0	100	91	91	2
		443.3	355.0	100	91	83	50
		443.3	399.2	100	91	59	26

RESULTS AND DISCUSSION

Screening using planar chromatography

The monitoring well sample was conspicuously coloured. The intense red shade indicated that the concentration level of the contamination was relatively high. Due to the visible colouration, the screening started with HPTLC separation and its different detection techniques. At first, the sample was directly applied onto an HPTLC plate. The plate was developed with the described HPTLC-AMD technique (the gradient is listed in the Supporting Information; 11.3.2). The analysis was accomplished by detecting UV light absorption through a multiple wavelength (MWL) scan and by detecting the fluorescence (fluorescence excitation at 366 nm). Several fluorescent zones were observed in the sample. The fluorescent properties of the zones suggest that the colouration is due to a hydrological fluorescent tracer.

Therefore, a further analysis under the same HPTLC conditions was carried out with reference samples of sulforhodamine B, eosin, uranine, malachite green and rhodamine B, chosen as they are commonly used in tracing experiments. Figure 3 shows the HPTLC plate of this run under fluorescence excitation at 366 nm. A mix standard was applied in addition to the sample and single standard solutions of the reference tracers.

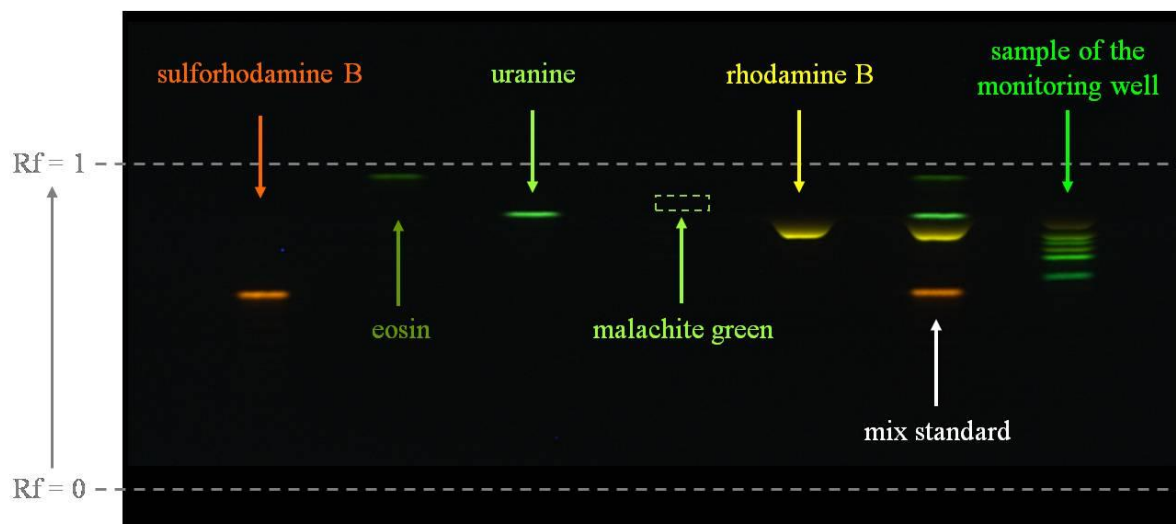


Figure 3: HPTLC separation of the sample and reference tracer dyes (excitation at 366 nm)
Malachite green does not fluoresce under this wavelength. The malachite green spot is marked as a box.

The fluorescent zone of the sample with the highest Rf value correlated to the rhodamine B standard zone. Thus, this zone could be tentatively identified as containing rhodamine B. None of the other zones from the sample track which were applied to the TLC plate could be allocated to a further tracer dye. Therefore, transformation products of rhodamine B were considered as possible compounds for the other fluorescent bands.

After optimisation of the gradient for the HPTLC method, the sample could be separated into six single zones (Fig. 4).

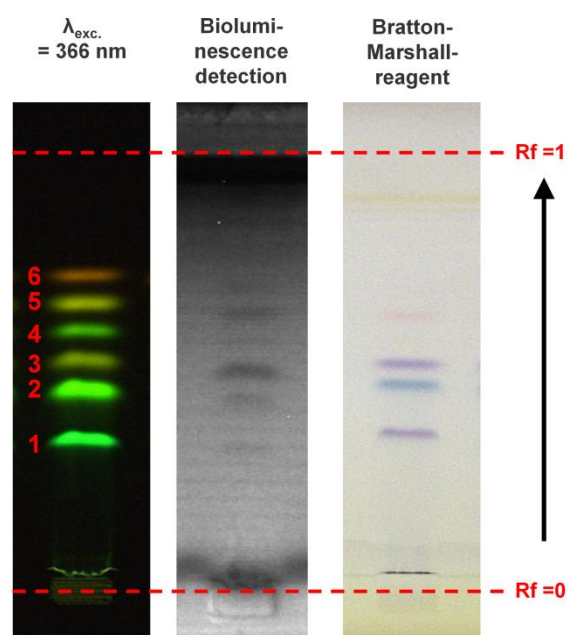


Figure 4: Comparison of results of the different detections on the HPTLC plate for the groundwater sample (optimised gradient)

The results of the bioactivity-based detection of the six zones are also shown in Fig. 4. After applying 1 mL of the original sample to the plate, it was developed with the optimised gradient and dipped into a solution of the luminescent bacteria *Vibrio fischeri*. The inhibition of the luminescent light correlates to the toxicity of the compounds towards *Vibrio fischeri*. The highest inhibition was observed for zone 3. However, until now, a semi-quantitative evaluation of the toxicity towards the bacteria has not been possible due to the lack of reference compounds.

Identification of rhodamine B and its de-ethylated transformation products

First, the fluorescent HPTLC zones 1 - 6 were extracted using the TLC/MS interface. The analysis of the extracts was performed using the nano-chip HPLC/QTOF system. The method settings are listed in Table 2. Transformation products of rhodamine B (N,N,N',N'-tetraethylrhodamine) were considered as possible compounds in zones 1 - 5. Authors such as He et al.¹² have described the degradation pathways of rhodamine B in laboratory experiments. The de-ethylation of rhodamine B might be regarded as a possible transformation reaction in anaerobic groundwater, analogous to the behaviour of atrazine.²⁰ For the screening of microbial degradation products of identified compounds the online Pathway Prediction System (PPS) of the University of Minnesota could be successfully used.²¹ The application of the PPS for rhodamine B showed the sample included five different de-ethylation products amongst others.²²

The nano-chip HPLC/QTOF analyses were run in positive ion ESI mode. Extracted ion chromatograms (EICs) were generated for the masses of the rhodamine B cation (m/z 443.2329) and those of its five de-ethylated transformation products (Table 3) with a tolerance of 10 ppm.

Based on the ion masses found, rhodamine B could be allocated to zone 6, N,N,N'-triethylrhodamine to zone 5, N-diethylrhodamine to zone 2 and rhodamine to zone 1. The mass of the isomers N,N-diethylrhodamine and N,N'-diethylrhodamine was confirmed in the extracts of zone 3 and 4. Rhodamine B was definitely identified in the extract of the sixth zone by MS/MS experiments using a reference compound.

Evaluation of the empirical formulae for the transformation product masses was carried out using the formula generator software. The generated formulae were identical with the formulae of the respective postulated de-ethylated transformation products. The calculated absolute scores were close to the optimum value of 100. Rhodamine (zone 1) had a slightly lower score because of a background peak on the second isotope peak that reduced the abundance and spacing matches. Detailed analysis results and the structural formulae are shown in Table 3. Based on these results, the deethylated transformation products of rhodamine B were identified in a groundwater sample

for the first time. However, further transformation products, such as benzoic acid that was found by He et al.,¹² could not be detected.

Due to the identical exact masses of the isomeric deethylated transformation products (N,N-diethylrhodamine and N,N'-diethylrhodamine), it was not possible to definitively allocate these two compounds to either zone 3 or zone 4 based solely on the results from the TOF-only mode. Although the product ion spectra of the two isomers were different, an assignment of the mass spectra to the isomers could not be achieved (see MS/MS spectra in the Supporting Information, 11.3.2). Therefore, allocation of the isomers to zones 3 and 4 was achieved with a specific colour reaction on the HPTLC plate. N,N-Diethylrhodamine has primary and tertiary amino groups whereas N,N'-diethylrhodamine only has secondary amino groups (see structures in Table 3). Consequently, verification of the presence of the primary amino group was carried out using the Bratton-Marshall reagent. The Supporting Information (11.3.2) includes the reaction scheme for N,N-diethylrhodamine. The discolouration of zones 1 to 3 indicated the presence of primary amino groups (Fig. 4). Based on the results of the colouration reaction using the Bratton-Marshall reagent, N,N-diethylrhodamine could finally be allocated to zone 3 and N,N'-diethylrhodamine to zone 4.

Table 3: Rhodamine B and its de-ethylated transformation products

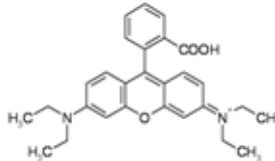
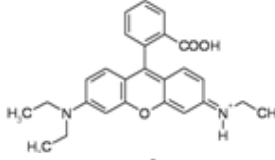
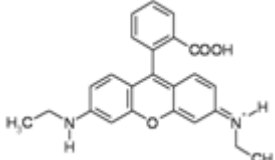
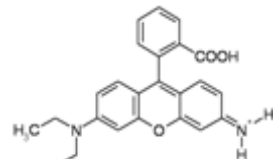
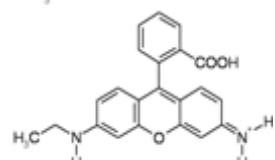
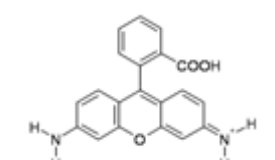
Zone	Compound	Formula	Precursor [M] ⁺ m/z	Score	Matches			Product ions		LC RT [min]	TLC Rf	Structure
					Mass	Abund.	Spacing	m/z	CE [eV]			
6	Rhodamine B (N,N,N',N'- tetraethylrhodamine)	C ₂₈ H ₃₁ N ₂ O ₃	443.2329	99.21	98.63	99.96	99.47	399.1699 385.1630 371.1398 355.1069	50	7.3	0.72	
5	N,N,N'-triethylrhodamine	C ₂₆ H ₂₇ N ₂ O ₃	415.2016	99.43	99.54	98.83	99.95	385.1549 371.1380 357.1352	47	6.8	0.66	
4	N,N'-diethylrhodamine	C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₃	387.1703	98.96	99.64	99.85	96.51	371.1372 358.1278 343.1148 331.1182	43	6.4	0.60	
3	N,N-diethylrhodamine	C ₂₄ H ₂₃ N ₂ O ₃	387.1703	98.01	97.54	97.78	99.23	357.1277 343.1071 329.1049 315.0858	43	6.3	0.53	
2	N-ethylrhodamine	C ₂₂ H ₁₉ N ₂ O ₃	359.1390	98.72	99.53	98.97	96.79	343.1113 331.1042 315.0885 303.0871	40	5.7	0.48	
1	Rhodamine	C ₂₀ H ₁₅ N ₂ O ₃	331.1077	90.37	99.88	93.77	67.3	314.0773 287.1174 285.1030 270.0949	37	5.2	0.36	

Figure 5 shows the overlaid EICs for rhodamine B and its transformation products. The most polar compounds eluted first. The two isomers, N,N-diethylrhodamine and N,N'-diethylrhodamine, could not be chromatographically separated with the chip used.

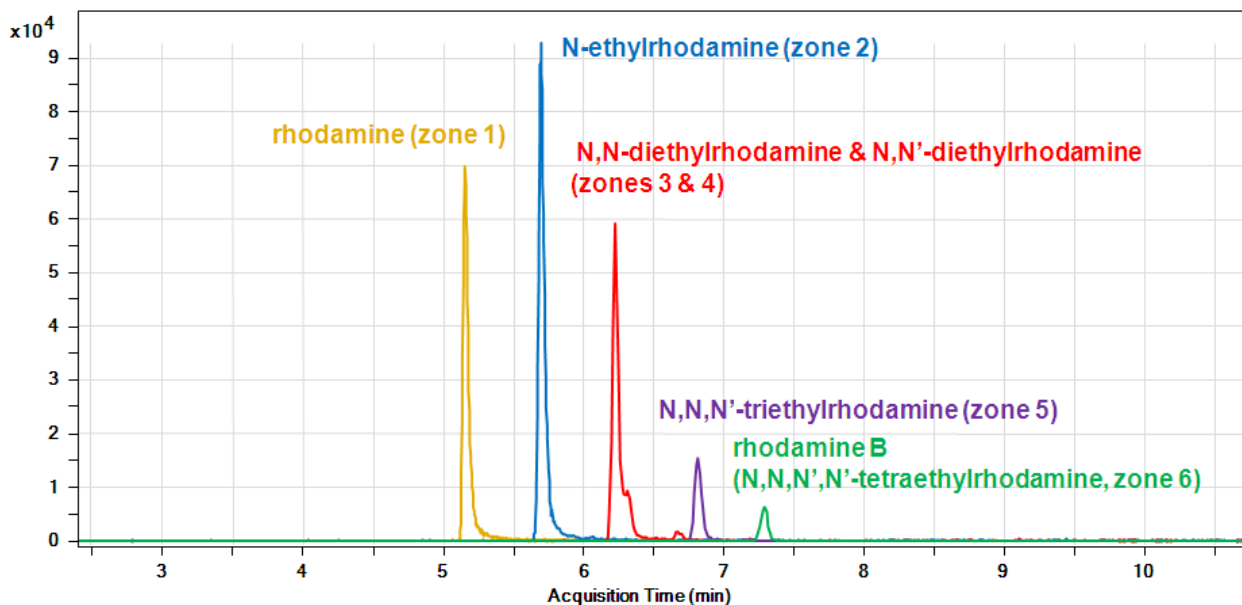


Figure 5: EICs of rhodamine B (N,N,N',N'-tetraethylrhodamine) and its de-ethylated transformation products (QTOF-MS)

Quantification of Rhodamine B

HPLC/MS/MS in multiple reaction monitoring (MRM) mode was applied to quantify rhodamine B in the groundwater sample. The settings of the method are shown in Table 2. The quantification was accomplished with an eight-point calibration. Due to the high sensitivity of the triple quadrupole system towards the rhodamine B cation, the sample had to be diluted with deionised water by a factor of 100. The detected concentration of rhodamine B was $83 \mu\text{gL}^{-1}$.

Due to the lack of reference standards, quantification of the de-ethylated transformation products was not possible. A concentration estimation was carried out for the transformation products with the rhodamine B calibration as a rhodamine B equivalent. The calculated concentrations of the transformation products are listed in Table 4.

Table 4: Calculated concentrations of the de-ethylated transformation products as rhodamine B equivalents

Substance	Peak area [counts]	Rhodamine B equivalent	Rhodamine B equivalent
Rhodamine B	22886	0.17	0.083
N,N,N'-triethylrhodamine	56954	0.4	0.2
N,N'-diethylrhodamine & N,N-diethylrhodamine	206310	1.6	0.7
N-ethylrhodamine	462157	3.5	1.4
Rhodamine	202615	1.5	0.6

Finally, historical research by the State Office for Geology, Resources and Mining (Freiburg, Germany) confirmed that a tracer experiment using rhodamine B took place at this site in 1978.

Coincidentally, the screening approach described above was used for another coloured water sample from another region in south Germany. In this sample, sulforhodamine B could be detected at a concentration of 1 mg L^{-1} . In addition, the mono-de-ethylated transformation product of sulforhodamine B was found in trace concentrations.

CONCLUSION

Various analytical systems were applied to screen and to analyse a sample from a groundwater monitoring well. Six fluorescent zones could be identified by using HPTLC and this led to the tentative identification of the tracer dye rhodamine B. After off-line extraction of the zones from the HPTLC plate, rhodamine B could definitely be identified in the sixth zone by MS/MS, it was quantified in the sample at $83 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ by HPLC/MS/MS.

Furthermore, five de-ethylated transformation products were detected for the first time in a groundwater sample more than 30 years after the application of the rhodamine B tracer. The detection was achieved by using nano-chip HPLC/QTOFMS. To allocate the de-ethylated transformation products to the five remaining HPTLC zones, the results of the HPLC/QTOF analysis and the colour reactions on the HPTLC plate were successfully examined. In addition, the inhibition effects of rhodamine B and its transformation products towards *Vibrio fischeri* were determined.

Overall, the combination of different separation and detection techniques enabled a fast and effective screening of the groundwater sample.

REFERENCES

1. Behrens H, Beims U, Dieter H, Dietze G, Eikmann T, Grummt T, Hanisch H, Henseling H, Käß W, Kerndorff H, Leibundgut C, Müller-Wegener U, Rönnefahrt I, Scharenber B, Schleyer R, Scholz W, Tilkes F. *Hydrogeol J.* 2001; **9**: 321.
2. Goldschneider N, Hötzl H, Käss W, Ufrecht W. *Environ. Geol.* 2003; **43**: 922.
3. Richardson SC, Willson CS, Rusch KA. *Ground Water* 2004; **42**: 678.
4. Chua LHC, Robertson AP, Yee WK, Shuy EB, Lo EYM, Lim TT, Tan SK. *Ground Water* 2007; **45**: 85.
5. Käss W. *Hydrogeological tracer technique (Hydrogeologische Markierungstechnik)*. 2nd revised edition, Gebrüder Borntraeger, Berlin - Stuttgart, 2004.
6. Leibundgut C, Maloszewski P, Külls C. *Tracers in Hydrology*. 1st edition, Wiley-Blackwell, 2009.
7. Flury M, Wai NN. *Rev. Geophys.* 2003; **41**: 1.
8. Kasnavia T, Vu D, Sabatini DA. *Ground Water* 1999; **37**: 376.
9. Magal E, Weisbrod N, Yakirevich A, Yechieli Y. *J. Hydrol.* 2008; **358**: 124.
10. European Food Safety Authority (EFSA). *The EFSA Journal* 2005; **263**: 1.
11. Horikoshi S, Saitou A, Hidaka H, Serpone N. *Environ. Sci. Technol.* 2003; **37**: 5813.
12. He Z, Sun C, Yang S, Ding Y, He H, Wang Z. *J. Hazard. Mater.* 2009; **162**: 1477.
13. Eberz G, Rast HG, Burger K, Kreiss W, Weisemann C. *Chromatographia* 1996; **43**: 5.
14. Schulz W, Seitz W, Weiss SC, Weber WH, Böhm M, Flottmann D. *J. Planar Chromatogr.* 2008; **21**: 427.
15. Weber WH, Seitz W, Schulz W, Wagener HA. *Vom Wasser* 2007; **1**: 3.
16. Luftmann H, Aranda M, Morlock GE. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; **21**: 3772.
17. Morlock GE, Jautz U. *J. Planar Chromatogr.* 2008; **21**: 367.
18. Plaß E. *CBS* 2006; **96**: 2.

19. DIN 32645 (Chemical analysis - Decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - Terms, methods, evaluation), Beuth Berlin-Vienna-Zurich, 2008.
20. Vargha M, Takás Z, Márialigeti K. *Water Res.* 2005; **39**: 1560.
21. Kern S, Fenner K, Singer HP, Schwarzenbach RP, Hollender J. *Environ. Sci. Technol.* 2009; [http://dx.doi.org/doi: 10.1021/es901979h](http://dx.doi.org/doi:10.1021/es901979h).
22. UM-BBD Pathway Prediction System, University of Minnesota. Available: <http://umbbd.msi.umn.edu/predict/> (accessed 12.02.2009).

5 Publikation III

Müller, A., Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water. *Water Research* 46, 679 - 690, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.033. Copyright Elsevier. Reproduced with permission.

Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water

Alexander Müller^{a,b}, Stefan C. Weiss^{a,b}, Judith Beißwenger^{a,c}, H. Georg Leukhardt^{a,c}, Wolfgang Schulz^{a*}, Wolfram Seitz^a, Wolfgang K. L. Ruck^b,
Walter H. Weber^a

^a *Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium,
Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau, Germany*

^b *Leuphana Universität Lüneburg, Institut für Umweltchemie, Scharnhorststr. 1,
21335 Lüneburg, Germany*

^c *Hochschule Aalen, Fakultät Chemie, Beethovenstraße 1, 73430 Aalen, Germany*

*Corresponding author:

Wolfgang Schulz

Tel.: +49 (0) 7345 96382291

Fax: +49 (0) 7345 96382290

E-mail address: Schulz.w@lw-online.de

Keywords: HPLC-QTOF-MS, HPTLC/AMD-MS, ozonation by-products, tolyltriazole, water purification

Abstract

During the treatment of surface water to drinking water, ozonation is often used for disinfection and to remove organic trace substances, whereby oxidation by-products can be formed. Here we use the example of tolyltriazole to describe an approach for identifying relevant oxidation by-products in the laboratory and subsequently detecting them in an industrial-scale process. The identification process involves ozonation experiments with pure substances at laboratory level (concentration range mg L^{-1}). The reaction solutions from different ozone contact times were analyzed by high performance liquid chromatography - quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HPLC-QTOF-MS) in full scan mode. Various approaches were used to detect the oxidation by-products: (i) target searches of postulated oxidation by-products, (ii) comparisons of chromatograms (*e.g.*, UV/VIS) of the different samples, and (iii) color-coded abundance time courses (kinetic) of all detected compounds were illustrated in a kind of a heat map. MS/MS, H/D exchange, and derivatization experiments were used for structure elucidation for the detected by-product. Due to the low contaminant concentrations (ng L^{-1} -range) of contaminants in the untreated water, the conversion of results from laboratory experiments to an industrial-scale required the use of HPLC-MS/MS with sample enrichment (*e.g.*, solid phase extraction.) In cases where reference substances were not available or oxidation by-products without clear structures were detected, reaction solutions from laboratory experiments were used to optimize the analytical method to detect ng L^{-1} in the samples of the industrial processes. We exemplarily demonstrated the effectiveness of the methodology with the industrial chemicals 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole (4- and 5-MBT) as an example. Moreover, not only did we identify several oxidation by-products in the laboratory experiments tentatively, but also detected three of the eleven reaction products in the outlet of the full-scale ozonation unit.

1. Introduction

Recently, the contamination of water resources by emerging pollutants has attracted increased attention from scientific research and consequently also public awareness. Emerging pollutants are compounds that are not yet routinely monitored; nevertheless, based on findings regarding their ecotoxicity, potential health hazards, distribution in various environmental compartments, and their public perception, will possibly be considered in the future (Norman, 2011). Emerging pollutants include pharmaceuticals (Daughton and Ternes, 1999), perfluorinated compounds (Skutlarek *et al.*, 2006), industrial chemicals and their transformation products (Farré *et al.*, 2008) and pesticide metabolites. Through their use in households (Trenholm *et al.*, 2008), in industry, or farming (Díaz-Cruz and Barceló, 2008), they reach the aquatic environment either directly or indirectly through municipal or industrial wastewater treatment plants (Farré *et al.*, 2008). When European river waters were screened for polar organic persistent pollutants, compounds of the benzotriazole group were found most frequently (Loos *et al.*, 2009). Annually, approximately

9000 Mg benzotriazoles are produced worldwide (Weiss *et al.*, 2006). The most important representatives of this group include 1H-benzotriazole (BT, CAS 95-14-7) and tolyltriazole (TT, CAS 64665-57-2), a mixture of the isomers 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole (4-MBT, CAS 29878-31-7 and 5-MBT, CAS 136-85-6; see Figure 2 for structural formulae). In water samples from the Glatt River, south of the Zurich airport, Switzerland, these compounds found in concentrations up to $3.70 \mu\text{g L}^{-1}$ (BT) and $0.63 \mu\text{g L}^{-1}$ (TT) (Giger *et al.*, 2006). When one of the major long-distance water suppliers of Baden Württemberg (*Zweckverband Landeswasserversorgung*) analysed 350 samples from the Danube River near Ulm in 2010, maximum (median) concentrations of $0.96 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.21 \mu\text{g L}^{-1}$) for BT, $0.36 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.15 \mu\text{g L}^{-1}$) for 4-MBT, and $0.24 \mu\text{g L}^{-1}$ ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) for 5-MBT (*cp.* Figure 4) were found. The higher concentration of 4-MBT vs. that of 5-MBT can be traced to differences in their biodegradability (Weiss, 2007; Weiss and Reemtsma, 2008). The contamination of water bodies is due mostly to the discharges from treated wastewater; samples of which contained concentrations of BT and TT up to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Giger *et al.*, 2006).

BT and TT are used as anticorrosives in aircraft deicer and anti-icer fluids and for ‘silver protection’ in dishwasher detergents (Weber *et al.*, 2009). In addition, BT and TT are used as additives in surface coatings, cooling lubricants, hydraulic fluids (Pillard *et al.*, 2001) and printing inks, and as UV light stabilizers for plastics (Breedveld *et al.*, 2003).

Numerous studies (*e.g.*, Cornell *et al.*, 2000; Pillard *et al.*, 2001) demonstrated a toxic effect of BT and TT on various organisms. Pillard *et al.* (2001) showed that, compared to BT and 4-MBT, 5-MBT had a markedly higher toxic effect on three test organisms, *Vibrio fischeri*, *Pimephales promelas*, and *Ceriodaphnia dubia*.

BT and TT are highly water-soluble (28 and 7 g L^{-1}), and have low vapor pressures, and low octanol-water distribution coefficients ($\log K_{\text{OW}}$ 1.23 and 1.89, respectively; Hart *et al.*, 2004). Due to the poor biodegradability and low sorption tendencies of BT and TT, their adequate removal by biological wastewater treatment, bioactive filters, and bank filtration is only marginally successful (Reemtsma *et al.*, 2010). Flocculation through Al^{3+} - or Fe^{3+} -salts is likewise problematic, but ozonation has proven to be an effective method to remove benzotriazoles (Reemtsma *et al.*, 2010).

The kinetics of benzotriazoles degradation through ozone was examined in various studies (*e.g.*, Vel Leitner and Roshani, 2010). Weiss *et al.* (2006) demonstrated that an ozone dose of 1 mg mg^{-1} dissolved organic carbon (DOC) was sufficient to remove over 99% of the BT and TT from the effluent of a wastewater treatment plant. However, independent of the reaction conditions and the available substances, the use of ozonation leads to oxidation by-products. The direct reaction with molecular ozone is very selective and occurs predominantly with compounds having functional groups that are easily oxidized by electrophilic ozone (Hoigné, 1988). The

indirect reaction through hydroxyl radicals, however, is not selective since the rate constants of reactions are at near diffusion-controlled values (von Gunten, 2003). The dominant mechanism strongly depends on the pH, alkalinity and concentration of dissolved organic materials (DOM) in the water. The trace substances are usually not completely mineralized (Schmidt *et al.*, 2010). Moreover, the oxidation by-products resulting from ozonation can be drinking water-relevant, as demonstrated, for example, by the tolylfluanid-fungicide metabolite N,N-dimethylsulfamide (DMS), which reacts with ozone to form N-nitrosodimethylamine (Schmidt and Brauch, 2008). Therefore, the knowledge of oxidation by-products is also important for the evaluation of waterworks-relevant organic trace substances.

At the Langenau waterworks, a part of the Zweckverband Landeswasserversorgung, water taken directly from the Danube River is purified to drinking water. In addition to purification steps, such as flocculation, multi-layer filtration, and granulated activated carbon filtration, ozonation is also used (Zweckverband Landeswasserversorgung, 2011). To ensure the quality of the drinking water, it is therefore especially important to understand the behavior of organic trace substances during the purification. Here we describe a novel strategy to rapidly determine relevant oxidation by-products of water contaminants. Generally, the reaction products were identified based on laboratory experiments, and then, based on their incidence, examined with an industrial process. 4- and 5-MBT were used as examples to compare the results of both isomers and the influence of the methyl group position with regard to the formation of oxidation by-products during ozonation was shown.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

4-MBT (98% pure) was purchased from Chemos (Regenstauf, Germany). 5-MBT, 1H-benzotriazole-5-carboxylic acid, 2,4-dinitrophenylhydrazine, dichloromethane (AMD Grade), methanol (AMD Grade), methyl *tert*-butyl ether (AMD CHROMASOLV[®]), and 4-isopropylbenzaldehyde (all >97% pure) were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Acetone, n-hexane (Uvasol), deuterium oxide, dipotassium hydrogen phosphate, ethanol, sodium chloride, sodium dicarbonate, sodium thiosulfate pentahydrate, and Titriplex III (all >98.5% pure), potassium iodate, N,N'-Diethyl-1,4-phenyldiamine, mercuric chloride (all per analysis), hyper grade methanol for LC-MS, ortho-phosphoric acid (85%), hydrochloric acid (32%, v/v), sulphuric acid (95-97%, v/v), sodium hypochlorite, Fast blue B hemi(zinc) salt, potassium iodide, 2,4-dinitrophenol, and formic acid (>98% pure) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol (AMD CHROMASOLV[®]), ammonium acetate, di-sodium hydrogen phosphate (anhydrous), silica gel with humidity indicator (orange gel), 2-propanol (CHROMASOLV[®]) and sodium peroxodisulfate (all >99% pure) were purchased from various companies (Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, Germany; Kraemer & Martin, Sankt Augustin, Germany; Fluka,

Steinheim, Germany; Riedel de Haën, Seelze, Germany; VWR, Leuven, Belgium). Ammonia solution (25%, v/v) was purchased from VWR (Fontenay-Sous-Bois, France).

2.2 Experimental ozonation setup

In the laboratory setup (Figure S3, Supplementary Information, 11.3.3), air was first dried over Silica gel (Merck, Darmstadt, Germany) and then pumped (30 L h^{-1}) through an ozone generator (Model COM-AD-01, Anseros, Tübingen, Germany) at 75% generator power. The ozone/air mixture was passed through two deionized water-filled gas washing bottles to remove nitric acid anhydride, and then over a glass frit (P1) into a deionized water-filled (950 mL) 1-L semi-batch reactor, which was placed on a magnetic stirrer (300 rpm) to mix the content thoroughly. After 60 min equilibration, ozone concentration was photometrically measured according to the German industry standard DIN 38 408-3 with N,N'-Diethyl-1,4-phenylenediamine sulfate (DPD). The result was in the range of $3.6 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$. Substances examined in the ozone experiments were dissolved in deionized water (100 mg per 50 mL) and given into the semi-batch reactor (molar ratio: MBT/O₃ = 10 : 1). In unbuffered experiments, the pH dropped during the reaction time from pH 7 to pH 3.5; the temperature remained constant at 25°C. After 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, and 60 min of ozone contact, 20 mL samples were removed from the reactor by discharge tap to a headspace vial containing approximately 15 mg sodium thiosulfate pentahydrate; a sample taken from the reactor before introduction of the experimental substance served as a blank. The vials were flanged and stored at 4 - 6°C until analysis. Total organic carbon (TOC) in the samples was determined according to the German industry standard DIN EN 1484 in a TOC-analyzer (IL 500, Hach Lange, Düsseldorf, Germany)

2.3 HPLC-QTOF-MS

High performance liquid chromatography (HPLC) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QTOF-MS) was used for oxidation by-product screening. The chromatographic instrument (1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisted of a degassing unit (G1322A), a binary pump (G1312A), an autosampler (G1313A), a thermostated column (G1316A), and a diode array detector (DAD, G1315B). A reversed-phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 1.8 μm , 4.6 \times 100 mm, Agilent Technologies) with a flow rate of 0.6 mL min^{-1} was used for liquid chromatography. The injection volume was 10 μl . As ionization modifiers, both eluents, HPLC water (A) and methanol (B), included 5 mM ammonium acetate in the negative electrospray ionization (ESI-) mode. The following gradient was used: 1 min isocratic with 5% B in A, a 12-min linear increase to 95% B, a 4-min wash with 95% B, and an 8-min equilibration with the starting solution of 5% B. The TT isomers were baseline-separated with ammonium carbonate (Weber *et al.*, 2009).

A reversed-phase column (Zorbax Eclipse XDB-C18, 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm, Agilent Technologies) with a flow rate of 0.15 mL min^{-1} was used for the hydrogen/deuterium (H/D) exchange experiments. The necessary deuterium was introduced as deuterium oxide (D_2O) with a flow rate of 0.25 mL min^{-1} through the reference spray of the ESI source (*cf.* Wolff and Laures, 2006). Under these conditions the H/D exchange was $>60\%$.

The QTOF-MS (6520, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) was run in ESI- mode with a capillary voltage of -3650 V; nitrogen (10 L min^{-1} ; 350°C) was used as drying gas, the spraying gas pressure was 50 psi. In MS-only mode, data was acquired at a scan rate of 1 spectrum s^{-1} and a scan range from m/z 30 to m/z 1050; the MS/MS experiments to determine structures were run at a scan rate of 2 - 3 spectra s^{-1} and collision energies ranging from 15 - 24 eV. For the continuous lock mass correction, two reference masses were used, m/z 119.0363 (purine) and m/z 980.0164 (Hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy) phosphazene).

Acquired data were evaluated with the MassHunter Workstation Software's Qualitative Analysis tools (version B.03.01, Build 3.1.346.0, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) as well as the software tools, Molecular Formula Generator (MFG) and Molecular Feature Extractor (MFE). Screening for oxidation by-products was done with the heat map graphics of the Software Mass Profiler Professional (Version 2.0, Build 99934, Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

2.4 HPLC-MS/MS

A highly sensitive HPLC-MS/MS system with solid phase extraction was used to verify the oxidation by-products identified in samples from the industrial drinking water purification process. The setting was chosen because of expected low concentrations of oxidation by-products. The Isolute ENV+ (200 mg, Biotage AB, Uppsala, Sweden) was used as solid phase. The water samples were acidified to pH 3 and concentrated by a factor of 500 (Müller *et al.*, 2011_A). Solid phase extracts were analyzed by HPLC (1200 Series Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), consisting of a degassing unit (G1379B), a binary pump (G1312B), an autosampler (G1367C) with cooling (G1330B), and a thermostated column (G1316B). The chromatographic conditions were the same as those described above for the HPLC-QTOF-MS. The HPLC was coupled to a Triple Quadrupol mass spectrometer (API 5000, AB Sciex, Foster City, CA). Electrospray ionization was carried out at 65 psi (spraying gas), 45 psi (drying gas), 30 psi (curtain gas), a drying temperature of 600°C, and an ionization voltage of -4200 V. Data were evaluated using Analyst Software (v. 1.5.1 AB Sciex, Foster City, CA).

2.5 HPTLC/AMD

We used high performance automated multiple development thin-layer chromatography (HPTLC/AMD) to separate substances in the HPLC fractions of samples taken from the semi-

batch reactor after 20 min of ozone contact. The principle of AMD separation is described in detail (*e.g.*, Burger, 1984). Silica gel glass plates (LiChrosphere Silicagel-60-F254 plates with fluorescence indicator, 200 x 100 mm, Merck, Germany) were pre-cleaned with 2-propanol and methanol. 100 μL of HPLC fractions were applied with an automatic applicator (automatic TLC Sampler 4, Camag, Muttenz, Switzerland) to the plates in 1 x 6 mm bands under a stream of nitrogen. HPTLC/AMD separation (AMD 2, Camag, Muttenz, Switzerland) was carried out with methanol (0.05% formic acid), dichloromethane, and n-hexane as the mobile phase (see Supplementary Information, Table S2 for further details, 11.3.3). In addition to visual detection with white and UV-light, the location-dependent light absorption in remission with multi-wavelength scans was measured (MWL TLC Scanner 3, Camag, Muttenz, Switzerland) at wavelengths 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300 nm. The data were evaluated with the software winCATS (Version 1.4.4.6337; Camag, Muttenz, Switzerland).

For improved identification of carbonyl compounds during structure elucidation, the samples were derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH; Jork *et al.*, 1989) directly on the plates. The TLC-MS-Interface (Camag, Muttenz, Switzerland; Luftmann *et al.*, 2007) was used offline to couple HPTLC with HPLC-QTOF-MS. During the 1-min extraction with 5 mmol L^{-1} ammonium acetate in a 50/50 mixture of water and acetonitrile the flow rate was 0.2 mL min^{-1} .

2.6 Water purification at the Langenau waterworks

The oxidation by-products determined in the prior laboratory-scale experiments might be relevant for the drinking water at the Langenau waterworks, because, in addition to ground water, surface water from the Danube, which consistently contains 4- and 5-MBT, is purified (*cp.* Figure 4). Therefore, it was necessary to monitor 4- and 5-MBT and their oxidation by-products during water purification. In the Langenau waterworks, the water taken directly from the Danube is pre-treated by flocculation in two flocculation units with a maximal flow rate of 2300 L s^{-1} . In addition to the coagulant Fe(III)-chloridesulfate an anionic flocculation aid based on polyacrylamide is applied. The subsequent intermediate ozonation occurs in bubble reactors with ozone dosages up to 5.0 mg L^{-1} (theoretical ozone contact time 17 min). The ozonated water passes through ten 50 m^2 two-layer filter units (hydro-anthracite and quartz sand, 1 m bed height for each layer). Before it enters the filtration units, Fe(III) is once again added to the water, and then a second filtration step with granulated activated carbon (ten units, each 50 m^2 , bed height of 2 m) follows. Finally, the treated surface water is mixed with ground water of the Danube Reed and disinfected with chlorine dioxide.

3. Concept for the screening and identification of oxidation by-products

Figure 1 shows a flowchart of the analytical process developed to identify and verify oxidation by-products of organic trace substances during the drinking water treatment with ozone. Reaction products were originally identified in laboratory experiments with high concentrations (mg L^{-1} range) of the substances of interest. For their subsequent determination at the ng L^{-1} range in the industrial-scale process an HPLC-MS/MS method with pre-enrichment was developed and optimized with the reaction solutions of the laboratory experiments. At various times after ozone contact, samples were taken from the semi-batch reactor during the laboratory experiments and analyzed by HPLC-QTOF-MS. If base material shows light-absorption it is meaningful to additionally use a DAD detector. In this approach oxidation by-products were then recognized by comparing UV-VIS or full scan chromatograms from samples with different successive oxidation contact times (e.g., Benner and Ternes, 2009), and by extracting ion chromatograms of postulated reaction products. For the postulation of oxidation by-products, known reactions of ozone with organic compounds, described in literature (e.g. Criegee mechanism; von Gunten, 2003), were adopted. Moreover, another way to screen for oxidation by-products was to look at the abundances of all detected sample compounds in relation to the ozone contact time and filter oxidation by-products by their kinetics. First, the compounds were extracted from the TOF full scan datasets with the help of special software (e.g., MFE, Müller *et al.*, 2011_A). All detected compounds, characterized by their retention times, exact masses, and abundances, were represented as two-dimensional matrices within which the standardized signal intensity was color-coded. The illustration of time courses (kinetics) of all detected compounds in a heat map allows filtering out reaction products by their degradation, intermediate, or formation kinetics visually (Müller *et al.*, 2011_B, see Supplementary Data, 11.3.3). All three approaches result in a comprehensive screening for oxidation by-products.

The first step of the structure elucidation is to carry out MS/MS and H/D exchange experiments for the detected reaction products. Additionally, fractions of the HPLC were separated by HPTLC/AMD. The combination of reversed and normal phase chromatography increases the peak capacity drastically (Stan and Schwarzer, 1998) and enables the separation of coeluted oxidation by-products. Functional groups of the molecule are then identified with various derivatization reactions and by coupling HPTLC/AMD with mass spectrometry (compare with Figure 1). The great advantage of using HPTLC with post-derivatisation and additional extraction of the derivate for the HPLC-QTOF-MS analysis is that there is no uncertainty in the allocation of reaction product and its derivative. Finally, the combination of all results of the structure elucidation leads to a tentative identification of the oxidation products.

Results of the laboratory experiments, however, cannot simply be transferred to the industrial-scale process (Frimmel *et al.*, 1993). Due to much lower concentrations, the detection

of reaction products in the industrial process requires an HPLC-MS/MS method along with pre-enrichment. This ‘target’ analysis can be optimized for both identified (when pure substances are not available) and unidentified reaction products by the use of reaction solutions from the laboratory-scale experiments.

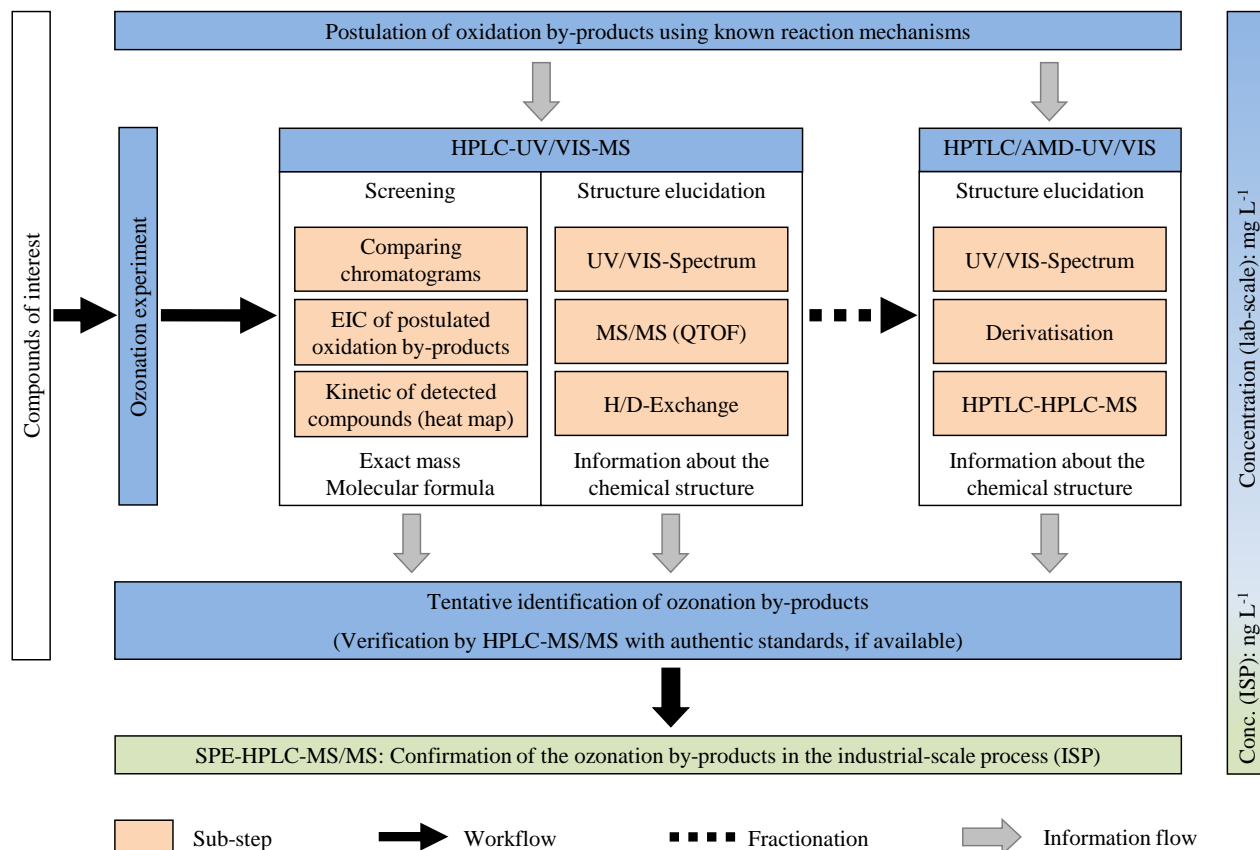


Figure 1: Concept for the screening and identification of oxidation by-products

4. Results and Discussion

4.1 Screening for oxidation by-products (lab-scale)

In laboratory experiments, both 4- and 5-MBT exhibited linear degradation kinetics within 30 min of ozone contact, whereby the TOC, by contrast, was depleted by only 10% (Figure 2). This low level of mineralization is indicative of the formation of oxidation by-products.

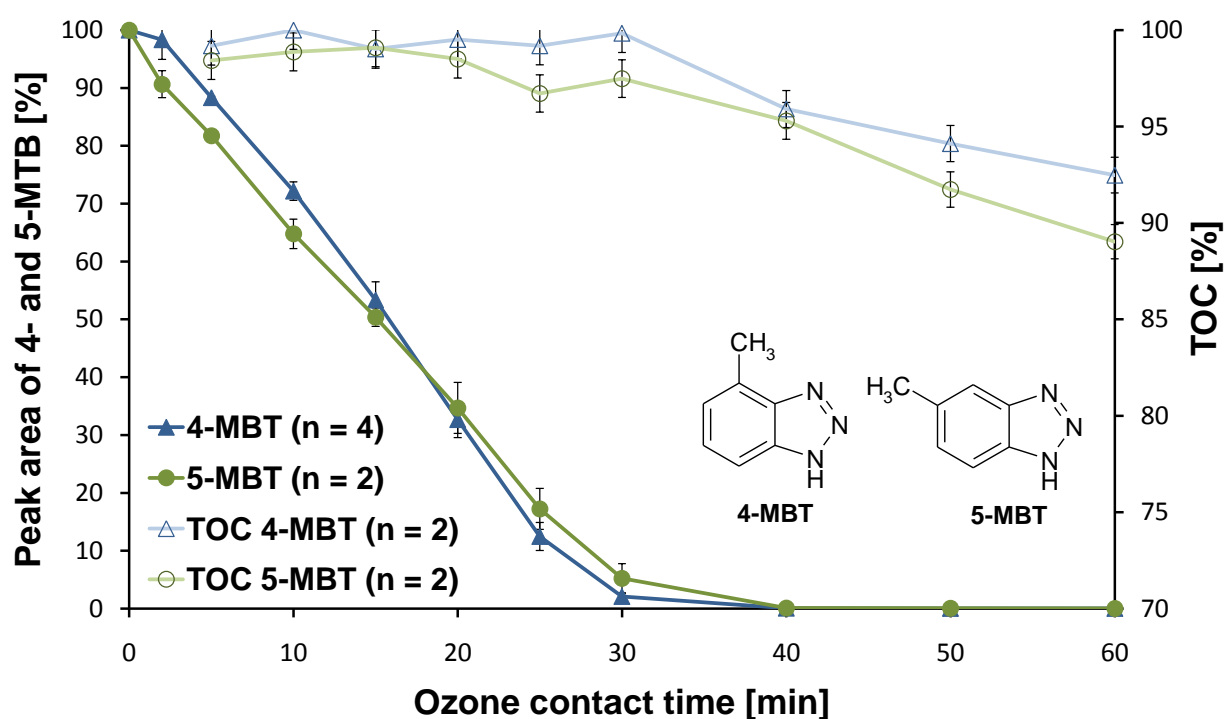


Figure 2: Decreases in the normalized peak areas of 4- and 5-MBT and total organic carbon (TOC) during the ozonation experiment. Vertical bars represent ranges of the N measurements.

A large number of possible oxidation by-products and their isomers could be postulated for the two precursor substances by the use of known ozonation reaction mechanisms. The postulation of oxidation by-products for 5-MBT according to the Criegee mechanism is exemplarily given in the Supplementary Information (Figure S9) as well as a partial list of the postulated reaction products for 4- and 5-MBT (Table S3 and S4, 11.3.3). First, the occurrence of proposed oxidation by-products was verified by extracting the corresponding ion chromatograms (EIC). Only a few other reaction products, not recognized by EIC, could be found by overlaying UV/VIS chromatograms of samples with different ozone contact times. In addition, the screening by compound kinetics (heat map) resulted in the detection of several dozen further possible oxidation by-products. Due to the large number of detected oxidation products it was not possible to mention all of them in this article. For reasons of clarity, the article is focused on the oxidation by-products for which the structure could be identified tentatively.

Below, we discuss the results of the six postulated and tentatively identified reaction products of the two precursor substances with molecular masses 125.0225 u (M125), 139.0382 u (M139), 147.0432 u (M147), 149.0589 u (M149), 163.0382 u (M163), and 165.0538 u (M165). The suggested structural formulae for M147, M149, and M163 are based on the oxidation of the methyl group in 4- and 5-MBT by ozone, while those for M125, M139, and M165 are based on the opening of the aromatic six-membered rings.

Table 1 contains a compilation of the molecular formulae, theoretical and empirically determined exact precursor ion masses, retention times, and postulated structural formulae for the six oxidation by-products. The mass differences between the theoretical and empirically determined precursor ion masses were less than 4 ppm. The extracted ion current chromatograms (EIC) of some of the individual oxidation by-products exhibited multiple peaks which are possibly isomers. The grey color-coded peaks were examined in more detail (Table 1). The mostly small differences in retention times between comparable oxidation by-products of 4- and 5-MBT can be explained by isomerism of the precursor compounds. Under the given conditions, predominantly M165, M147 (4- and 5-MBT), and M139 (4-MBT) by-products were formed by the ozonation. The position of the methyl group can have a significant influence on the formation of these by-products. For example, M125 was only detected following ozonation of 5-MBT, and M139 was formed from 4-MBT in manifold higher concentrations than from 5-MBT.

Table 1 also shows the time course of the peak areas of the individual reaction by-products normalized to their respective biggest peaks. The kinetics of the respective oxidation by-products M147, M163, and M165 were basically the same for 4- and 5-MBT. However, clear differences were observed for both the formation of M149 and the degradation of M139 between the two precursor compounds (Table 1).

Table 1: Results from the HPLC-QTOF-MS screening of the six oxidation by-products (ESI-)

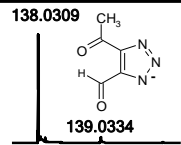
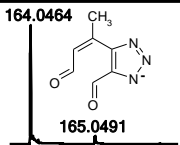
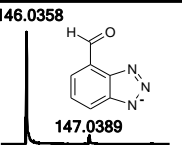
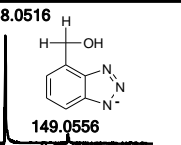
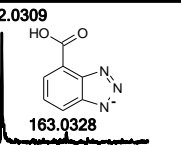
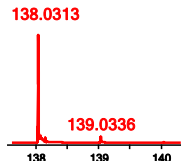
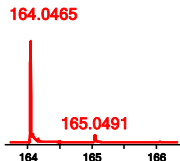
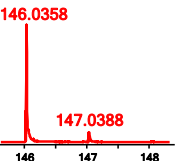
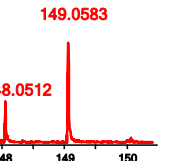
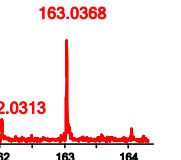
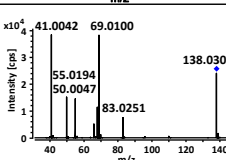
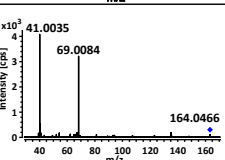
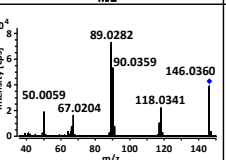
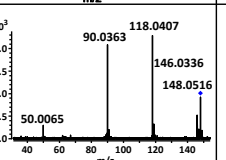
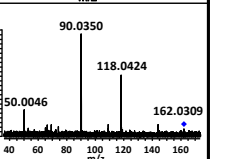
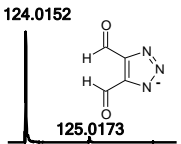
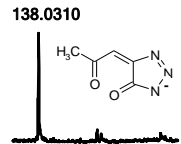
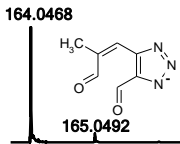
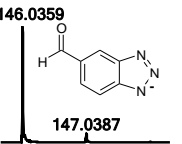
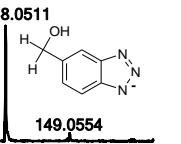
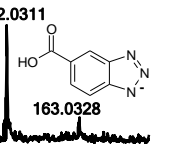
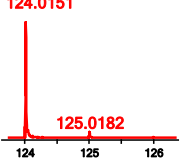
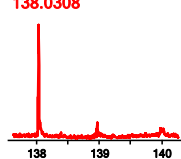
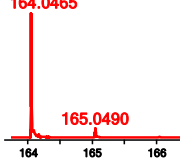
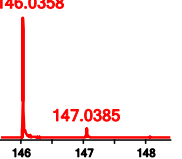
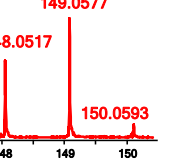
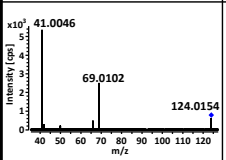
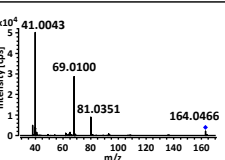
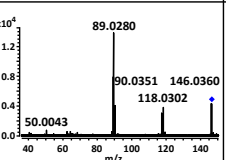
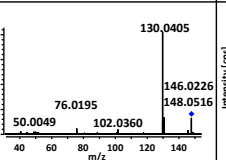
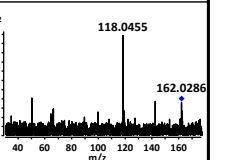
General details	Characteristic	Oxidation by-products with ring cleavage			Oxidation by-products without ring cleavage		
	Abbreviation	M125	M139	M165	M147	M149	M163
	[M-H] ⁻ : m/z (theor.)	124.0152	138.0309	164.0466	146.036	148.0516	162.0309
4-MBT	Molecular formula	C ₄ H ₃ N ₃ O ₂	C ₅ H ₅ N ₃ O ₂	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂	C ₇ H ₅ N ₃ O	C ₇ H ₇ N ₃ O	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂
	[M-H] ⁻ : m/z (exp.)	-	138.0309 (Δ = 0.1 ppm)	164.0464 (Δ = 1.2 ppm)	146.0358 (Δ = 1.3 ppm)	148.0516 (Δ = 0.3 ppm)	162.0309 (Δ = 0.2 ppm)
	Retention time [min]	-	5.7 (4-MBT)	8.6 (4-MBT)	9.5 (4-MBT)	9.0 (4-MBT)	5.4 (4-MBT)
EIC	Intensity [cps]						
	Retention time [min]						
Proposed structure	Structure						
	Structure						
5-MBT	[M-H] ⁻ : m/z (exp.)	124.0152 (Δ = 0.4 ppm)	138.0310 (Δ = 0.7 ppm)	164.0468 (Δ = 1.5 ppm)	146.0359 (Δ = 0.5 ppm)	148.0511 (Δ = 3.9 ppm)	162.0311 (Δ = 1.4 ppm)
	Retention time [min]	3.9 (5-MBT)	6.0 (5-MBT)	8.4 (5-MBT)	9.2 (5-MBT)	8.6 (5-MBT)	3.0 (5-MBT)
	EIC						
Proposed structure	Structure						
	Structure						
4-/5-MBT	Kinetics						

4.2 Structure elucidation

4.2.1 MS/MS and H/D exchange experiments with HPLC-QTOF-MS

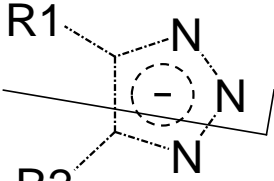


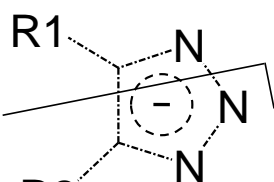


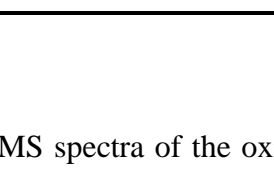

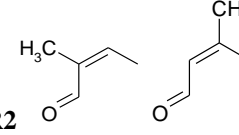
The results of the H/D exchange experiments and the MS/MS spectra for the reaction products of 4- and 5-MBT are shown in Table 2. A positive H/D exchange indicated the presence of azide hydrogen atoms in the molecules. Functional groups such as hydroxy groups possess an exchangeable hydrogen atom. Comparative analyses of the HPLC-QTOF-MS spectra with and without the addition of D₂O showed mass shifts of only 1 u in the isotope patterns of M149 and M163. This corresponds to the structural formulae of the oxidation by-products shown in Table 1, and further confirms the choice of the postulated structural formulae given in Tables S3 and S4 (Supplementary Information, 11.3.3).

Table 2: Results of the structure elucidation using HPLC-QTOF-MS (ESI-)

		Oxidation by-products with ring cleavage			Oxidation by-products without ring cleavage		
		M125	M139	M165	M147	M149	M163
4-MBT	MS (normal)	Not detected					
	MS (with D ₂ O)	Not detected					
	MS/MS	Not detected					
5-MBT	MS (normal)						
	MS (with D ₂ O)						<p>Intensity too low</p>
	MS/MS		<p>Intensity too low</p>				

The oxidation by-products with and without ring cleavage were examined separately to interpret the MS/MS spectra. The MFG software tool (allowed elements: C,H,N,O) was used to calculate the formulae for experimental product ions. Table 3 lists the theoretical masses of proposed product ions of the oxidation by-products with ring cleavage. For these products it was expected that the various substituted triazol rings are cleaved by MS/MS as shown in table 3. The empirical m/z values of the product ions (Table 2) for M125, M139, and M165 correspond well to the theoretical values (Table 3).

Table 3: Overview of the product ions of M125, M139, and M165 (with ring cleavage)

Basic structure of by-product	By-product	R1/R2	Product ion m/z (theor.)	Product ion - N ₂ m/z (theor.)
	M125	R1  (CHO)	69.0094 (C ₂ HON ₂)	41.0033 (C ₂ HO)
		R2  (CHO)	69.0094 (C ₂ HON ₂)	41.0033 (C ₂ HO)
	M139	R1  (CHO)	69.0094 (C ₂ HON ₂)	41.0033 (C ₂ HO)
		R2  (C ₂ H ₃ O)	83.0251 (C ₃ H ₃ ON ₂)	55.0189 (C ₃ H ₃ O)
	M165	R1  (CHO)	69.0094 (C ₂ HON ₂)	41.0033 (C ₂ HO)
		R2  (C ₄ H ₅ O)	109.0407 (C ₅ H ₅ ON ₂)	81.0346 (C ₅ H ₅ O)

MS/MS spectra of the oxidation by-products formed without ring cleavage can be interpreted as follows. For M147 (C₇H₄N₃O), the product ion C₇H₄NO (m/z 118.0298) was formed from the precursor by loss of nitrogen; this ion then broke down into the product ions C₆H₃N (m/z 89.0271) and C₆H₄N (m/z 90.0349) following loss of the aldehyde group which results from the oxidation of the methyl group during ozonation. By contrast, for M149 (C₇H₇N₃O) and M163 (C₇H₅N₃O₂), first the alcohol (M149) or carboxylic acid (M163) groups resulting from the oxidation of the methyl group broke as CH₃O (M149) or CHO₂ (M163), forming the product ion C₆H₄N₃ (m/z 118.0411), before nitrogen (product ion C₆H₄N, m/z 90.0349) was eliminated.

However, the MS/MS spectrum of the M149 by-product from 5-MBT differs from this fragmentation pattern. In this case the observed product ion (m/z 130.0405, $C_7H_4N_3$) can be explained by the hydroxylation of the aromatic ring and the subsequent elimination of water. Thus, the markedly differing formation and degradation kinetics of the two M149 by-products can be explained by the differing positions of the hydroxyl groups on the precursor molecules.

The proposed 1H-benzotriazol-5-carboxylic acid structure for M163 (5-MBT) was confirmed by comparison with a reference standard. Unfortunately, there was no reference standard available for the respective by-product from 4-MBT. But the dominant CO_2 loss (see MS/MS spectra Table 2) is typical for a carboxylic acid and can be seen as qualification of the postulated structure. The difference in the retention times between the two isomers, 1H-benzotriazol-4-carboxylic acid and 1H-benzotriazol-5-carboxylic acid, can be explained by the formation of intramolecular hydrogen bonds in 1H-benzotriazol-4-carboxylic acid (compare structures in Table 1).

4.2.2 HPTLC/AMD with derivatization and coupling with MS

To further verify the proposed structures, we used HPTLC/AMD together with derivatization and mass spectrometry. Figure 3 (“Original”) shows an example of the fluorescence quenching at 254 nm for the HPLC fraction of the M165 by-product from 4-MBT and the remission at two different wavelengths after HPTLC/AMD separation. In addition, the HPLC-QTOF-MS chromatogram of the ion trace m/z 164.0466 (M165) of zone 1 (extracted from the plate by TLC-MS interface) shows the separation of different isomers. To confirm the presence of carbonyl groups in the molecule, we carried out a derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (2,4-DNPH) after separation of the fraction. After derivatization, the plate showed intensive staining under white light, and the HPLC-QTOF-MS chromatogram of the HPTLC extract (zone 1) showed peaks of m/z 524.1032 with double the retention time (Figure 3, “Derivatized with 2,4-DNPH”). The m/z 524.1032 indicated a two-fold derivatization of the M165 ($[M-H]^+$: m/z 164.0466) by-product.

We also detected two carbonyl groups for each of the M165 (5-MBT), M125 (5-MBT), and M139 (4-MBT) by-products and one such group for the M147 by-product from both 4- and 5-MBT. However, the M149 and M163 (4- and 5-MBT) and M139 (5-MBT) by-products could not be detected by HPTLC/AMD.

Based on the structure elucidation experiments, the M163 (5-MBT) by-product was unambiguously identified as 1H-benzotriazole-5-carboxylic acid and the M147 as either 1H-benzotriazole-4-carbaldehyde respectively 1H-benzotriazole-5-carbaldehyde. For the remaining oxidation by-products, the proposed structures shown in Table 1 were confirmed, although they may also denote the respective isomers.

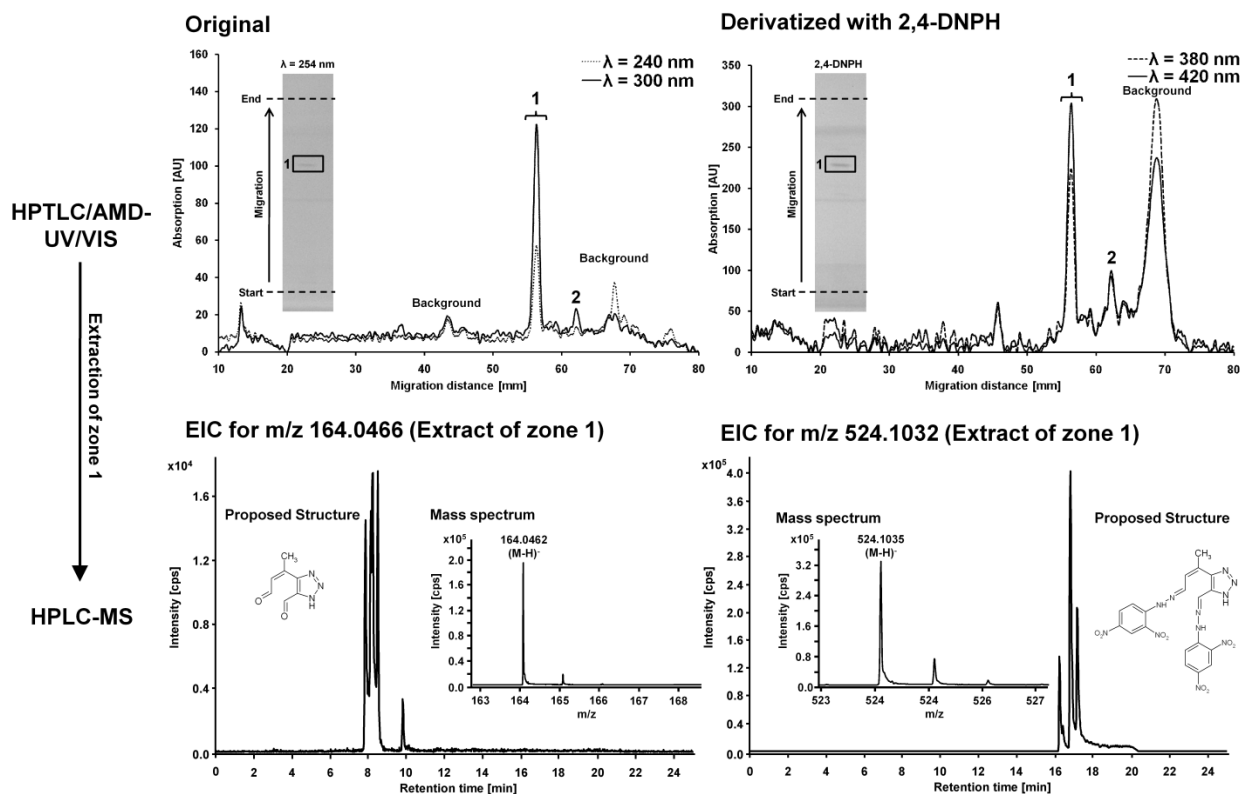


Figure 3: Results of the HPTLC-UV/VIS and HPTLC-MS of M165 (4-MBT)

4.3 Determination of oxidation by-products during water purification

For the development of the HPLC-MS/MS, the choice of mass transitions was based on the MS/MS spectra of the HPLC-QTOF-MS measurements (see Table 2). Because the reaction products were not available as pure substances, the respective diluted reaction solutions from the laboratory experiments were used to optimize the mass spectrometric settings (Supplementary Information, Table S1, 11.3.3). Due to the low concentrations of 4- and 5-MBT in the unprocessed water an enrichment step was necessary to detect the oxidation by-products identified in the laboratory-scale experiments in the industrial process, we used the reaction solutions generated in the laboratory experiments to optimize the SPE method. The solutions were diluted by the same factor as the untreated water was enriched, and following the peak areas of the enriched samples were compared with those of the starting solutions. The recovery rates of the various by-products were in the range of 30% (M139) - 125% (M163), however, it was not possible to enrich the most polar oxidation by-product M125 with this SPE method.

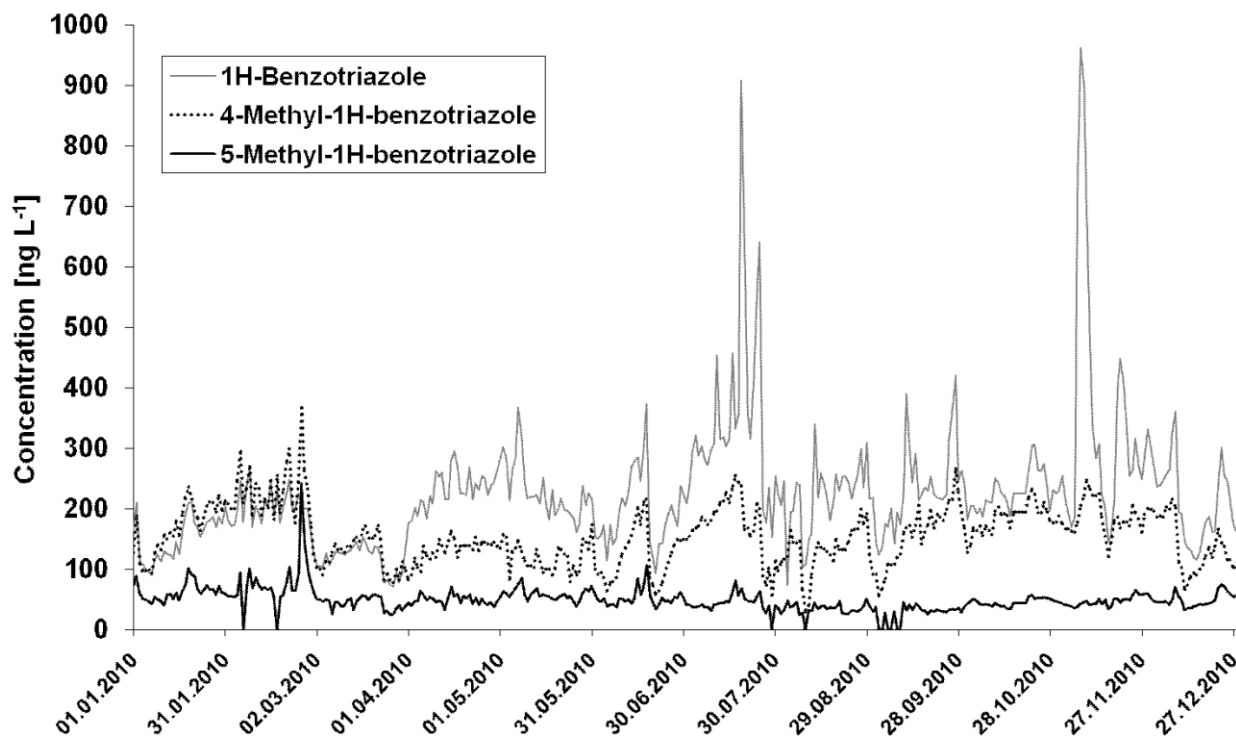


Figure 4: Time variation curve for BT, 4- and 5-MBT in the Danube River (Leipheim, Germany) over the year 2010

Examination of different water samples from the drinking water treatment process showed the concentrations of 4- and 5-MBT before the ozonation to be approximately 160 ng L^{-1} and 40 ng L^{-1} . The ozonation process removed approximately 90% of the concentrations. For the flocculation and filtration treatment steps, no significant reductions were observed for 4- and 5-MBT concentrations. The M139, M147, and M165 by-products were detected in the water samples that were taken directly after ozonation and before multi-layer filtration. For the mass transitions $138 \rightarrow 69$ (M139), $146 \rightarrow 89$ (M147) and $164 \rightarrow 41$ (M165) Figure 5 shows chromatograms of four representative samples taken during the treatment process. Changes in the signals between the ozonation and the multi-layer filtration (hydro-anthracite, quartz sand) can be explained by the additional 13-min contact with 0.6 mg L^{-1} ozone. As these oxidation by-products were no longer detected in the enriched water samples after the subsequent granulated activated carbon filtration, they are not relevant to drinking water. For the oxidation by-products of M147 (1H-benzotriazole-4-carbaldehyde or 1H-benzotriazole-5-carbaldehyde) no toxicological data were found.

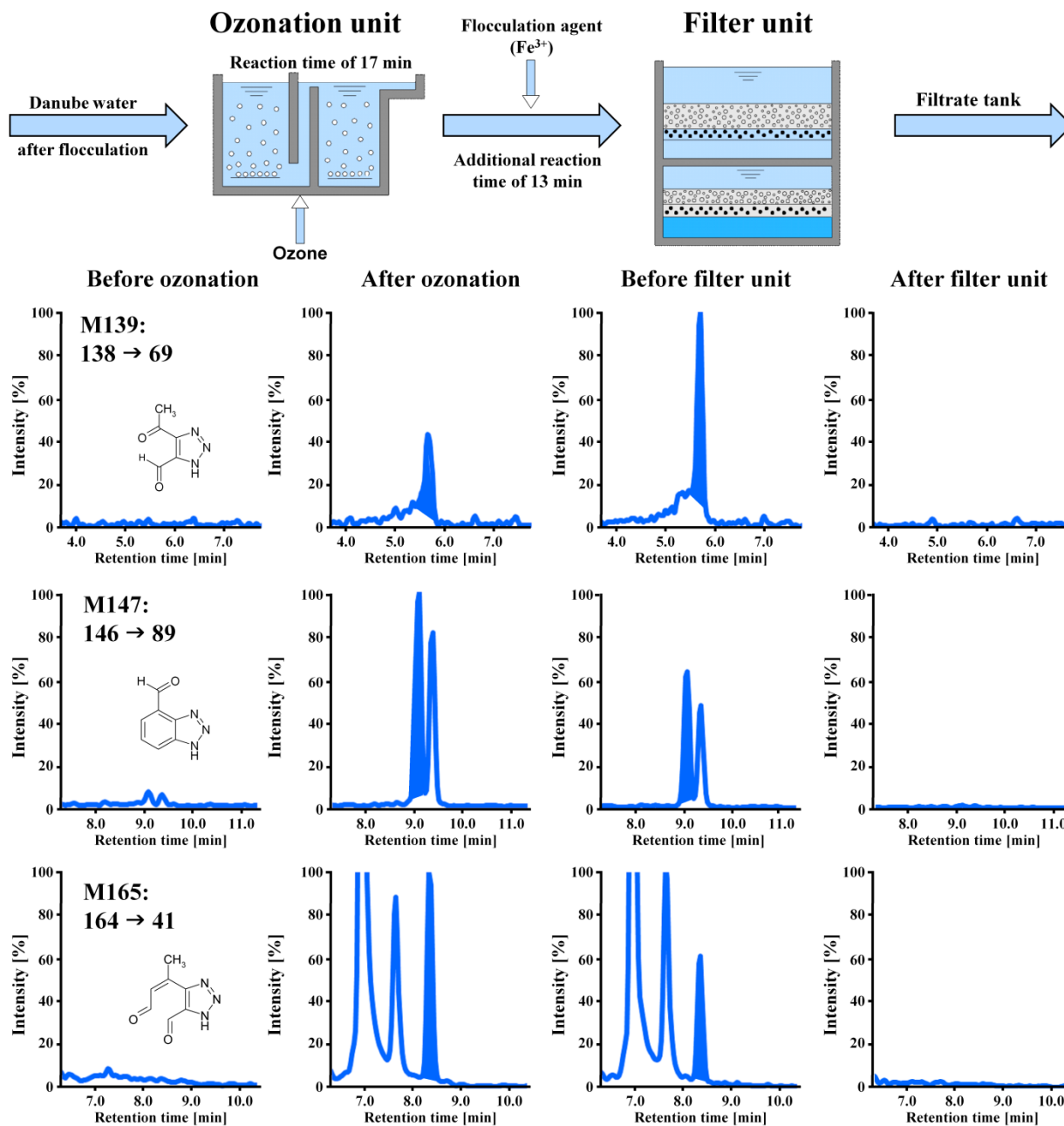


Figure 5: Determination of oxidation by-products M139, M147, and M165 in different process waters of the water purification process

5. Conclusion

A concept for the identification of relevant oxidation by-products of an ozonation process on a laboratory scale and its transfer to an industrial-scale water treatment process was illustrated with tolylriazole as an example. The use of heat maps to visualize the abundances of compounds in HPLC-QTOF-MS datasets after various reaction times made a rapid identification of the reaction- and intermediate products possible. Moreover, through the use of MS/MS and H/D exchange measurements together with chemical derivatization coupled with MS, structures were proposed for some of the reaction by-products.

The ozonation of 4- and 5-MBT, resulted, on the one hand, in the oxidation of the methyl groups to carboxylic acid, and on the other hand, led to the formation of aldehydes and ketones by ring cleavage. The triazole ring remained intact under the chosen conditions. Oxidation by-products with masses of 139.0382 u ($C_5H_5N_3O_2$), 147.0432 u ($C_7H_5N_3O$; 1H-benzotriazole-4-carbaldehyde or 1H-benzotriazole-5-carbaldehyde), and 165.0538 u ($C_7H_7N_3O_2$) were detected in the water samples after ozonation. Subsequent multi-layer and activated carbon filtration however removed these substances. Thus, the use of this strategy to identify oxidation by-products in laboratory-scale experiments and to check for their presence in industrial-scale processes allowed the targeted assessment of oxidation by-product relevance in drinking water.

6. References

- Benner J. and Ternes T.A., Ozonation of propranolol: formation of oxidation products, *Environmental Science & Technology* 43 (13), 2009, 5086-5093.
- Breedveld G.D., Roseth R., Sparrevik M., Hartnik T. and Hem L.J., Persistence of the de-icing additive benzotriazole at an abandoned airport, *Water, Air and Soil Pollution: Focus* 3 (3), 2003, 91-101.
- Burger K., Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie), [TLC-PMD, Thin-layer chromatography with gradient-elution in comparison to HPLC (DC-PMD)], *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 318 (3), 1984, 228-233.
- Cornell J.S., Pillard D.A. and Hernandez M.T., Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid, *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (6), 2000, 1465-1472.
- Daughton C.G. and Ternes T.A., Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?, *Environmental Health Perspectives* 107 (6), 1999, 907-944.
- Díaz-Cruz M.S. and Barceló D., Trace organic chemicals contamination in ground water recharge, *Chemosphere* 72 (3), 2008, 333-342.
- DIN EN 1484, Water analysis - Guidelines for the Determination of Total Organic Carbon (TOC) and Dissolved Carbon (DOC), 1997, German version EN p. 1484.
- DIN 38 408-3, Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Fachnormenausschuss Wasserwesen im DIN, [German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; gaseous components (group G); determination of ozone (G 3)], 1993, Deutsches Institut für Normung (e. V).

- Farré M.I., Pérez S., Kantiani L. and Barceló D., Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 27 (11), 2008, 991-1007.
- Frimmel F.H., Abbt-Braun G., Baldauf G., Brauch H.-J., Grohmann A., Hamsch B., Huber S., Huber W., Kühn W., Maier D., Rohmann U., Scherer P., Schullerer-Jagiella S., Steuer W., Wagner I., Werner P. and Wricke B., Wasserchemie für Ingenieure, [Water chemistry for engineers], In: Oldenbourg R., (Ed), *DVGW*, 1993 München, Germany.
- Giger W., Schaffner C. and Kohler H.P.E., Benzotriazole and tolyltriazole as aquatic contaminants. 1. Input and occurrence in rivers and lakes, *Environmental Science & Technology* 40 (23), 2006, 7186-7192.
- Hart D.S., Davis L.C., Erickson L.E. and Callender T.M., Sorption and partitioning parameters of benzotriazole compounds, *Microchemical Journal* 77 (1), 2004, 9-17.
- Hoigné J., In: Stucki Samuel, (Ed), *The Chemistry of Ozone in Water. From: Process Technologies for Water Treatment*, 1988, Plenum Press; New York, USA.
- Jork H., Funk W., Fischer W. and Wimmer H., Dünnschicht-Chromatographie - Reagenzien und Nachweismethoden, [Thin-Layer Chromatography - reagents and detection methods], 1989, VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim, Germany. Band 1a.
- Loos R., Gawlik B.M., Locoro G., Rimaviciute E., Contini S. and Bidoglio G., EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environmental Pollution* 157 (2), 2009, 561-568.
- Luftmann H., Aranda M. and Morlock G.E., Automated interface for hyphenation of planar chromatography with mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21 (23), 2007, 3772-3776.
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., in press. New approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere* 85 (8), 2011_A, 1211-1219.
- Müller A., Schulz W., Jung N., Ruck W.K.L. and Weber W.H., Schnelles Screening auf Reaktionsprodukte bei der Ozonung im Labormaßstab, [Rapid screening for reaction products of ozonation on a laboratory scale], *Vom Wasser* 109 (2), 2011_B, 35-37 (English version, see Supplementary Data, 11.3.3).
- Norman, 2011. http://www.norman-network.net/index_php.php?module=public/about_us/comment_substances&menu2=public/about_us/about_us, (accessed 08.12.11.).

- Pillard D.A., Cornell J.S., DuFresne D.L. and Hernandez M.T., Toxicity of benzotriazole and benzotriazole derivatives to three aquatic species, *Water Research* 35 (2), 2001, 557-560.
- Reemtsma T., Miehe U., Duennbier U. and Jekel M., Polar pollutants in municipal wastewater and the water cycle: occurrence and removal of benzotriazoles, *Water Research* 44 (2), 2010, 596-604.
- Schmidt C.K., Brauch H.-J., N, N-Dimethylsulfamide as precursor for N-Nitrosodimethylamine (NDMA), formation upon ozonation and its fate during drinking water treatment, *Environmental Science & Technology* 42 (17), 2008, 6340-6346.
- Schmidt T.C., Lutze H. and Merkel W., Möglichkeiten und Grenzen oxidativer Verfahren in der Wasseraufbereitung, [Capabilities and limits of oxidative processes in water treatment], *Vom Wasser* 108 (2), 2010, 41-47 (only in German available).
- Skutlarek D., Exner M. and Färber H., Perfluorinated surfactants in surface and drinking waters, *Environmental Science & Pollution Research* 13 (5), 2006, 299-307.
- Stan H.-J. and Schwarzer F., On-line coupling of liquid chromatography with thin-layer chromatography, *Journal of Chromatography A* 819 (1-2), 1998, 35-44.
- Trenholm R.A., Vanderford B.J., Drewes J.E. and Snyder S.A., Determination of household chemicals using gas chromatography and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1190 (1-2), 2008, 253-262.
- Vel Leitner N.K. and Roshani B., Kinetic of benzotriazole oxidation by ozone and hydroxyl radical, *Water Research* 44 (6), 2010, 2058-2066.
- Von Gunten U., Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation, *Water Research* 37 (7), 2003, 1443-1467.
- Weber W.H., Müller A., Weiss S.C., Seitz W. and Schulz W., 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt- Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe, [1H-Benzotriazole and tolyltriazoles in the aquatic environment - occurrence in ground, surface and wastewater], *Vom Wasser* 107 (1), 2009, 16-24 (only in German available).
- Weiss S., Jakobs J. and Reemtsma T., Discharge of three benzotriazole corrosion inhibitors with municipal wastewater and improvements by membrane bioreactor treatment and ozonation, *Environmental Science & Technology* 40 (23), 2006, 7193-7199.

- Weiss, S. 2007. Potential of membrane bioreactors for the removal of persistent polar pollutants in municipal wastewaters (Potential von Membranbioreaktoren zur Entfernung von polaren persistenten Spurenstoffen aus Kommunalabwasser), Dissertation, TU Berlin, Germany.
- Weiss S. and Reemtsma T., Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment - a viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface water?, *Water Research* 42 (14), 2008, 3837-3847.
- Wolff J.-C. and Laures A.M.F., "On-the-fly" hydrogen/deuterium exchange liquid chromatography/mass spectrometry using a dual-sprayer atmospheric pressure ionisation source, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20 (24), 2006, 3769-3779.
- Zweckverband Landeswasserversorgung, 2011. http://www.lw-online.de/trinkw_auf_fluss.html, (accessed 08.05.11.) only in German available.

6 Publikation IV

Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Schnelles Screening auf Ozonungsprodukte in Laborversuchen. Vom Wasser 108, 35-37.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Schnelles Screening auf Reaktionsprodukte bei der Ozonung im Labormaßstab

Müller, A.^{1,2}, Langenau/D, Schulz, W.¹, Langenau/D, Jung, N.¹, Langenau/D,
Ruck, W.K.L.², Lüneburg/D, Weber, W.H.¹, Langenau/D

¹Zweckverband Landeswasserversorgung, Betriebs- und Forschungslaboratorium,
Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau

²Leuphana Universität Lüneburg, Institut für Umweltchemie,
Scharnhorststraße 1, 21335 Lüneburg

Einleitung

Die Trinkwasserversorgung in Deutschland erfolgt im Wesentlichen aus Grund- und Oberflächenwasser. Der anthropogene Einfluss auf die Wasserressourcen zeigt sich durch den Nachweis von organischen Spurenstoffen [1]. Neben Arznei- und Röntgenkontrastmitteln [2] sowie Pflanzenschutzmitteln und deren Metaboliten [3] gehören Industriechemikalien, beispielsweise die Substanzgruppe der Benzotriazole [4], zu den am häufigsten vorkommenden anthropogenen Spurenstoffen in der aquatischen Umwelt. Aus diesem Grund muss ihr Verhalten bei den unterschiedlichen Prozessen der Wasseraufbereitung untersucht werden. Bei der Verwendung von Ozon findet zusätzlich zur Desinfektion vielfach auch eine Oxidation der organischen Spurenstoffe statt. Abhängig von den Bedingungen, beispielsweise der Ozonkonzentration, der Kontaktzeit oder dem pH-Wert kann die Reaktion über verschiedene Zwischenstufen bis hin zur vollständigen Mineralisierung der Spurenstoffe verlaufen [5]. Die gebildeten Oxidationsneben-

produkte können trinkwasserrelevant sein, wie das Beispiel des Tolyfluamid-Metaboliten Dimethylsulfamid (DMS) gezeigt hat, das mit Ozon zu N-Nitrosodimethylamin reagiert [6]. Deshalb ist die Identifizierung von Oxidationsnebenprodukten für die Beurteilung der Trinkwasserqualität von Bedeutung. Aufgrund der geringen Konzentrationen der Spurenstoffe in den Wasserressourcen ist hierfür die Durchführung von Laborversuchen mit deutlich höheren Konzentrationen der Kontaminanten erforderlich. Die Untersuchung der Probelösungen erfolgt mittels anreicherungsfreier Flüssigkeitschromatographie und hochauflösender massenspektrometrischer Detektion (LC-QTOF/MS). Die Aufgabe der daran anschließenden Datenanalyse besteht darin, aus der Vielzahl an detektierten Komponenten die Oxidationsnebenprodukte der jeweiligen Ausgangsverbindung herauszufiltern.

Laborversuche

Der Aufbau der Laborversuchsanlage ist in Bild 1 schematisch dargestellt. Vor jedem Experiment wurde Ozon durch das im Reaktor vorgelegte deionisierte Wasser (950 mL) geleitet. Die Ozonkonzentration im Reaktor (einstellbar bis 6 mg/L) ließ sich über die Ozongeneratorleistung regeln und wurde während der Versuchsdurchführung konstant gehalten. Nach Zugabe von 100 mg Ausgangsverbindung, gelöst in 50 mL deionisiertem Wasser, erfolgten die Probenentnahmen nach unterschiedlichen Reaktionszeiten. Zur Beendigung der Reaktion wurde den Proben Natriumthiosulfat zugesetzt. Als Blindwert diente eine Probe, die vor Zugabe der Ausgangsverbindung aus dem Reaktor entnommen wurde.

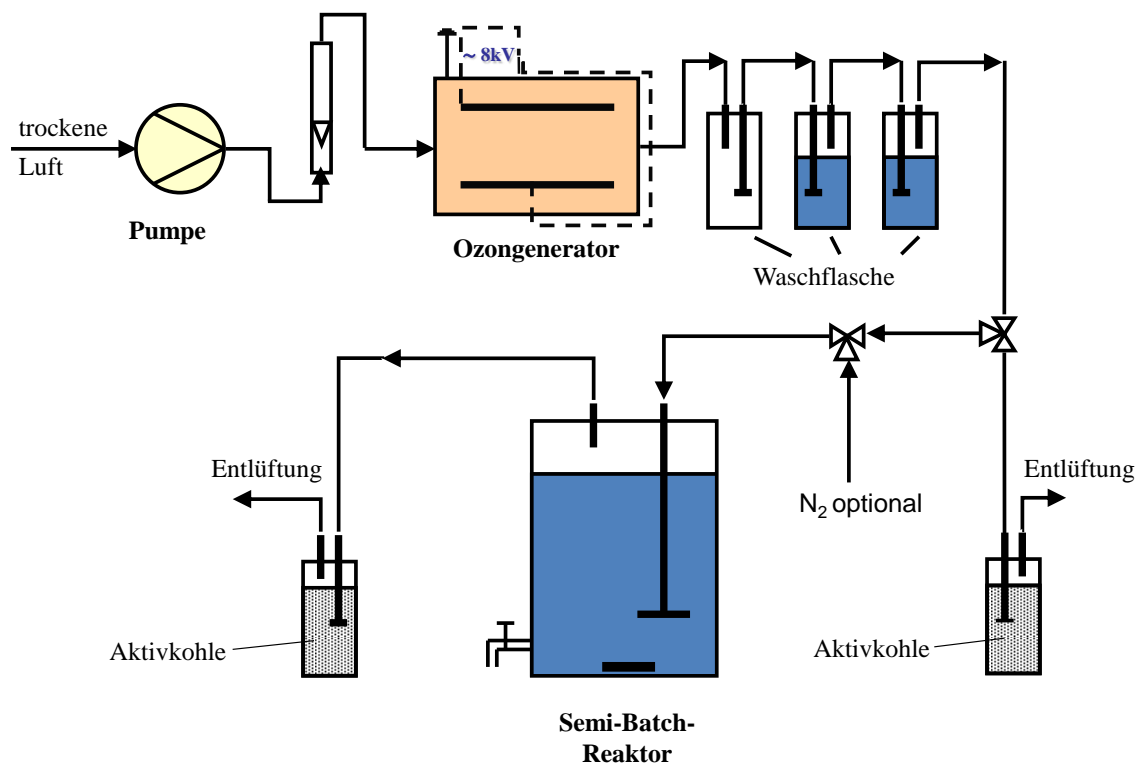


Bild 1: Schematische Darstellung der Ozonierungsversuchsanlage [7]

Analyse und Auswertung

Die Analyse der Wasserproben, die zu unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten entnommen wurden, erfolgte ohne Probenvorbereitung direkt mittels LC-QTOF/MS im Full-Scan-Modus über einen Massenbereich von m/z 35 bis 1000. In Bild 2 A ist ein auf diese Weise erhaltener Datensatz exemplarisch als Konturplot abgebildet. Zu jeder Retentionszeit liegt ein vollständiges Massenspektrum (1 Scan/s) vor. Die Intensität der detektierten Massen ist durch Farb- bzw. Grautöne dargestellt. Bild 2 B zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Konturplots. Sowohl entlang der Zeit- als auch der Massenachse ist der peakförmige Verlauf der Intensität deutlich zu erkennen. Das Herausfiltern derartiger Signale (Features) erfolgt durch einen geeigneten Rechenalgorithmus (z. B. mit dem Molecular Feature Extractor[®]). Ermittelte Features werden nur dann als nachgewiesen akzeptiert, wenn diese in drei Wiederholmessungen auftreten. Diese Vorgehensweise ist bei Features mit geringer Intensität zur statistischen Absicherung zu empfehlen. Abhängig von der verwendeten Software und den gewählten Parametereinstellungen können verschiedene Features über die Massendifferenz als Isotope bzw. als weitere Moleküladdukte identifiziert und zu einem einzigen Feature (Komponente) zusammengefasst werden.

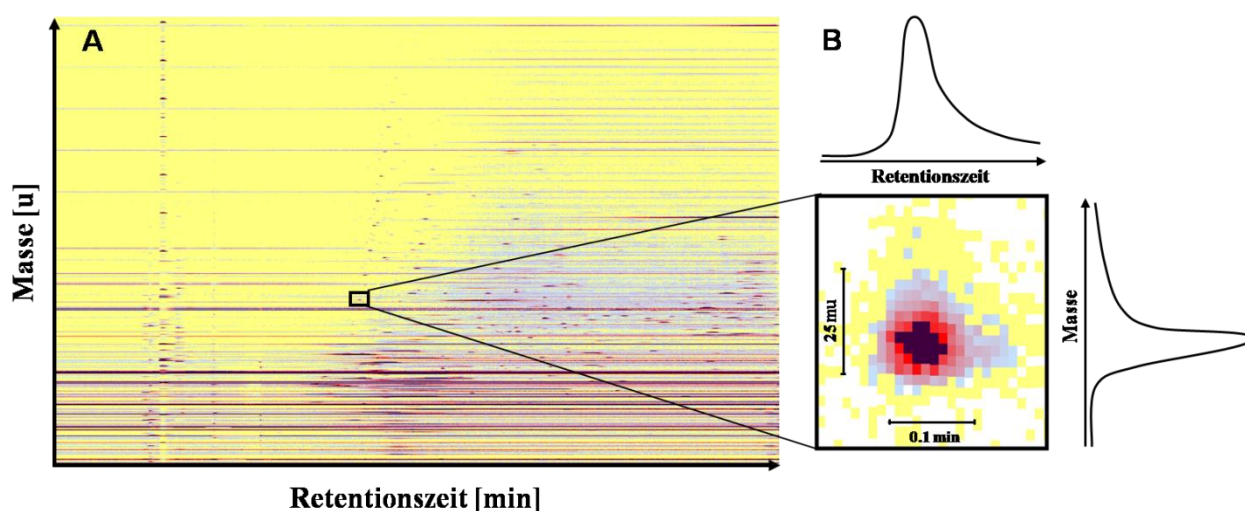


Bild 2: Konturplot eines Datensatzes (A) mit vergrößertem Feature (B)

Die Auswertung der Full-Scan-Datensätze führt für jede Probe zu einer Komponentenliste, die aus mehreren hundert Einträgen mit exakten Massen, Retentionszeiten und Intensitäten bestehen kann. Zum Herausfiltern von Komponenten, die als mögliche Reaktionsprodukte in Frage kommen, wird deren jeweiliger Intensitätsverlauf über die Reaktionszeiten betrachtet. Zur schnellen Beurteilung des Intensitätsverlaufs eignet sich die so genannte Heat-Map-Darstellung. Hierbei werden die Komponenten der Proben als zweidimensionale Matrix abgebildet (Bild 3). Die standardisierte Signalintensität ist in Farb- bzw. Graustufen codiert. Anhand des zeitlichen Graustufen- bzw. Farbverlaufs jeder Komponente über die Ozonkontaktzeiten können mögliche

Reaktionsprodukte (Abbau-, Zwischenprodukt und Bildungskinetik) schnell aus einer Vielzahl von Komponenten erkannt werden.

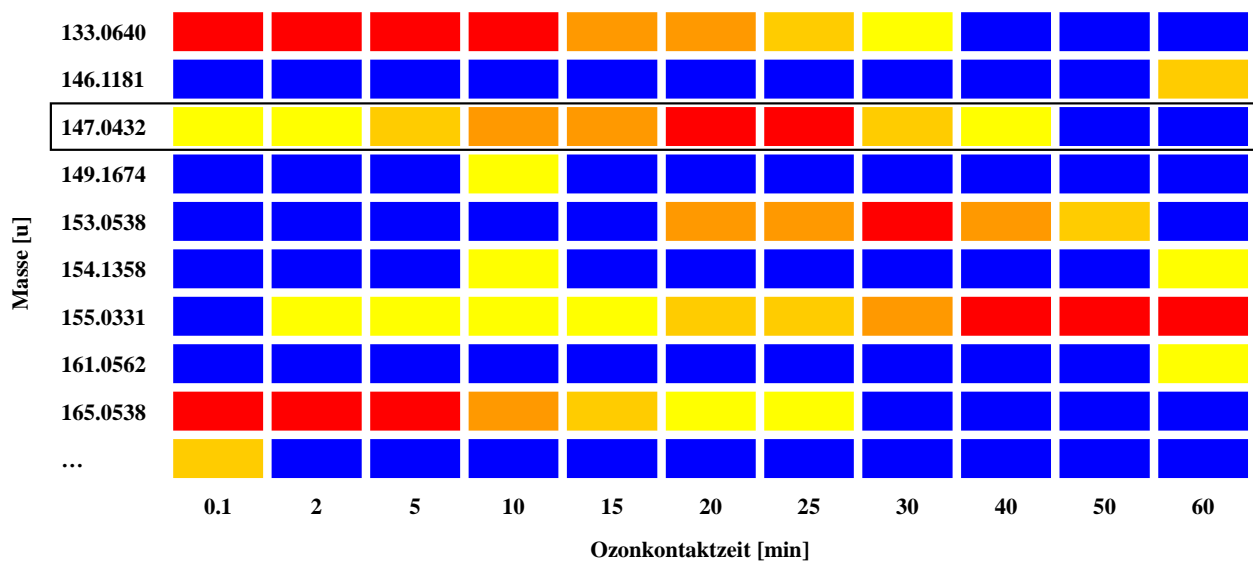


Bild 3: Ausschnitt der Heat-Map (rot = hohe Intensität, blau = keine/geringe Intensität)

Zur Verdeutlichung der beschriebenen Heat-Map ist der Intensitätsverlauf für die Masse 147,0432 u in Bild 4 exemplarisch dargestellt. Zu jeder Ozonkontaktzeit ist die entsprechende Grau- bzw. Farbstufe abgebildet. Diesen typischen Verlauf für ein Zwischenprodukt zeigt analog die Komponente mit der Masse 153,0538 u (vgl. Bild 3). Dagegen zeigt die Heat-Map für die Komponente mit der Masse 155,0331 u die Bildungskinetik eines Reaktionsprodukts. Der Intensitätsverlauf für die Masse 133,0640 u entspricht der Abbaukinetik der Ausgangsverbindung 4-Methyl-1H-benzotriazol.

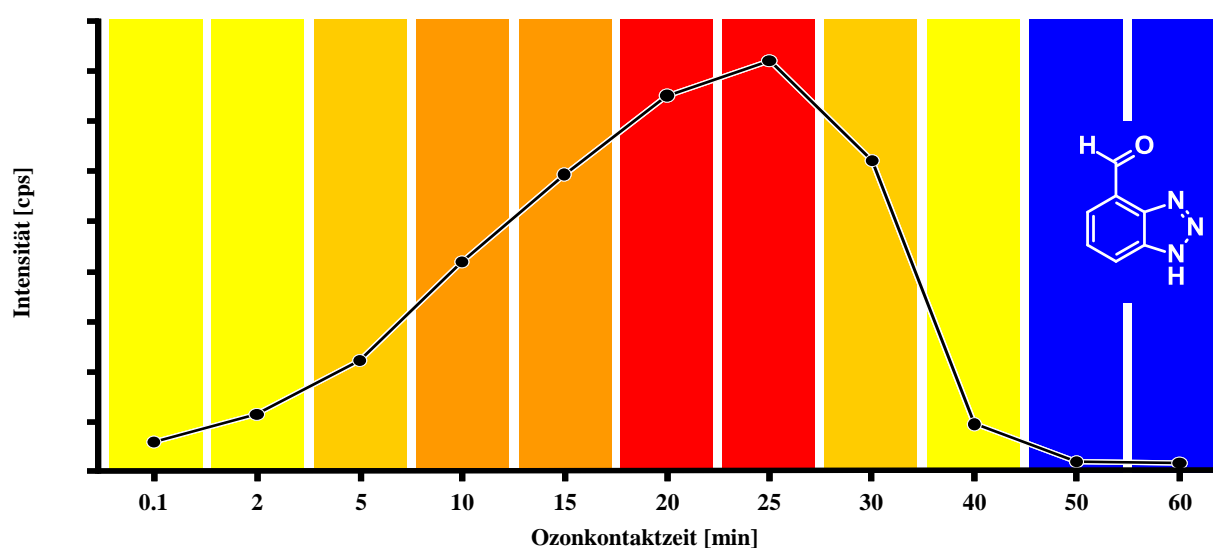


Bild 4: Intensitätsverlauf für die Komponente mit der Masse 147,0432 u (rot = hohe Intensität, blau = keine/geringe Intensität)

Anhand der exakten Massen und der Isotopenmuster der Komponenten ist es möglich, Summenformelvorschläge zu berechnen. Hinweise zur Struktur können beispielsweise aus MS^n -Spektren, über einen H/D-Austausch und mit Hilfe spezifischer Derivatisierungsreaktionen erhalten werden. In Abb. 4 ist für die Masse 147,0432 u ein Strukturvorschlag (1H-benzotriazol-4-carbaldehyd) angegeben.

Zusammenfassung und Ausblick

Die beschriebene Vorgehensweise ermöglicht ein schnelles Screening auf relevante Reaktionsprodukte bei der Ozonung im Labormaßstab. Durch die Darstellung als Heat-Map können relevante Komponenten schnell anhand ihres zeitlichen Intensitätsverlaufs erkannt werden. Diese Strategie lässt sich auch auf andere Fragestellungen, beispielsweise die Überwachung von Oberflächengewässern, übertragen. Das Bild 5 zeigt den Ausschnitt einer Heat-Map ermittelt aus den LC-QTOF/MS-Messungen von 12-h-Mischproben eines Oberflächengewässers über einen Zeitraum von sieben Tagen. Eine nahezu konstante Belastung mit der Komponente der Masse 273,1934 u bei der Retentionszeit von 8,1 min ist deutlich zu erkennen. Im Gegensatz dazu tritt die Komponente mit der Masse 270,1769 u und der Retentionszeit von 10,5 min erst ab dem 5. Tag, die Komponente der Masse 272,0904 u mit Retentionszeit von 12,2 min nur am 5. Tag auf. Die beschriebene Vorgehensweise kann als effektives Hilfsmittel bei der Auswertung von LC-MS-Chromatogrammen, insbesondere beim Non-Target-Screening, eingesetzt werden.

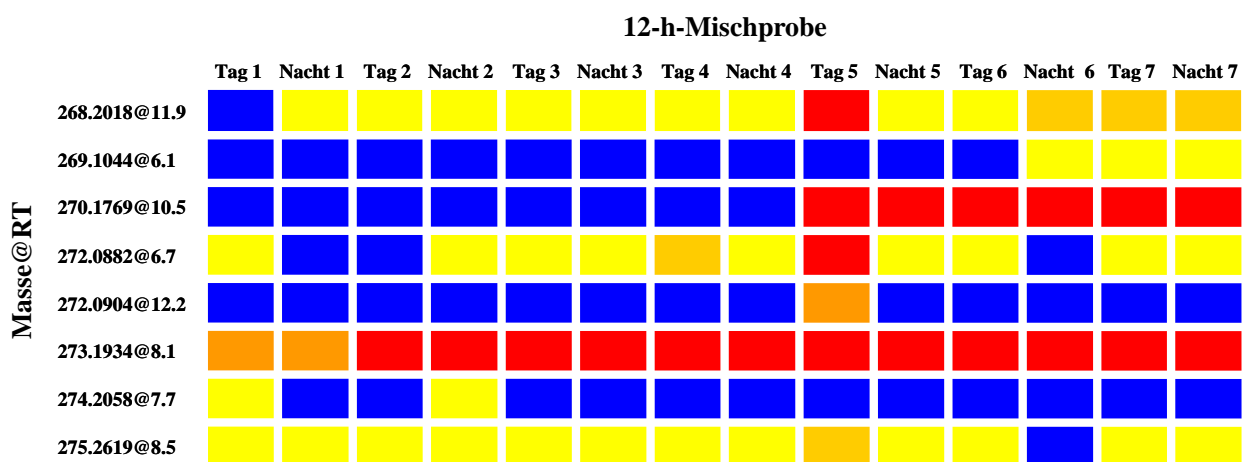


Bild 5: Ausschnitt der Heat-Map von 12-h-Mischproben einer Oberflächengewässerüberwachung (rot = hohe Intensität, blau = keine/geringe Intensität)

Literatur:

- [1] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* **1999**, 107, 907-944
- [2] S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, *Environ. Int.* **2009**, 35 (5), 803-814
- [3] J.V. Sancho, Ó.J. Pozo, M. Ibáñez, F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386 (4), 987-997
- [4] W.H. Weber, A. Müller, S.C. Weiss, W. Seitz, W. Schulz, *Vom Wasser* **2009**, 107 (4), 16-24
- [5] T.C. Schmidt, H. Lutze, W. Merkel, *Vom Wasser* **2010**, 108 (2), 41-47
- [6] C.K. Schmidt, H.-J. Brauch, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42 (17), 6340-6346
- [7] W. Seitz, *Dissertation*, University of Surrey, Großbritannien, **2007**

Anmerkung:

Die englische Version dieser Publikation befindet sich in Kapitel 11.3.3.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Überwachung der zur Trinkwassergewinnung genutzten Wasserressourcen kommt in den letzten Jahren neben dem Target-Screening auf anthropogene Spurenstoffe zunehmend auch das Non-Target-Screening zum Einsatz. Der Begriff des **Non-Target-Screenings** gemäß Hernández et al. (2005) umfasst Verfahren, bei denen alle Probenkomponenten, die der Analysetechnik zugänglich sind, detektiert und nach Möglichkeit in ihrer Gesamtheit zur Auswertung sowie Beurteilung des Screenings herangezogen werden. Da keine Fokussierung auf bestimmte Analyten erfolgt, ermöglicht dies zusätzlich zum Nachweis von bekannten Substanzen auch das Auffinden und Identifizieren von nicht erwarteten bzw. unbekanntem Substanzen. Die Methodik und der dafür benötigte Zeit- und Arbeitsaufwand für solche Screenings hängen stark von der zugrunde liegenden Fragestellung (**Publikationen I - IV**) und dem Kenntnisstand über die Proben (Art und Herkunft, mögliche Kontaminanten, Konzentrationen etc.) ab. Um ein effizientes und umfassendes Non-Target-Screening gewährleisten zu können, muss deshalb die Vorgehensweise jeweils der Fragestellung und dem Kenntnisstand angepasst werden.

Generell kann es in die Schritte **Screening** auf Probenkomponenten und deren **Identifizierung** unterteilt werden. Für die Durchführung eines Non-Target-Screenings auf mittelpolare bis polare Spurenstoffe wird heute die HPLC gekoppelt mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (z. B. TOF oder Orbitrap) im Full-Scan-Modus genutzt. Die Full-Scan-Datensätze werden mit unterschiedlichen Softwaretools ausgewertet. Die Identifizierung erfolgt durch Datenbankabfragen und strukturaufklärende Experimente.

Ziel dieser Arbeit war es, für die Teilschritte **Screening** und **Identifizierung** beim Non-Target-Screening verschiedene Strategien der Durchführung und Auswertung zu erarbeiten und ihre Effizienz an realen Fallbeispielen aufzuzeigen. Die zentrale Analysetechnik stellte das HPLC-QTOF-MS-System dar. Ergänzend wurden zur Strukturaufklärung die HPTLC/AMD und zur quantitativen Bestimmung von identifizierten Spurenstoffen die HPLC-MS/MS verwendet. Die Analysen der Proben erfolgten entweder anreicherungsfrei oder nach SPE-Anreicherung. Beim **Screening** wurden meist die Probenkomponenten mit Hilfe eines Algorithmus (Molecular Feature Extractor) aus den Full-Scan-Datensätzen extrahiert. Hierbei wurden bis zu mehreren Tausend Komponenten pro Probe ermittelt. Die Vorgehensweise zum Herausfiltern der relevanten Probenkomponenten aus der Gesamtheit aller detektierten Komponenten unterschied sich je nach vorgegebener Fragestellung (**Publikationen I - IV**) deutlich. Da nach dem Screening immer die Massen und Retentionszeiten der jeweils als relevant ermittelten Komponenten bekannt waren, ähnelte sich natürlich der Ablauf der **Identifizierung** bei allen Fallbeispielen sehr.

Die **Publikation I** (Kapitel 3) beschreibt einen neuen Ansatz für die Auswertung eines Non-Target-Screenings von organischen Spurenstoffen in der aquatischen Umwelt. Ein Schwerpunkt

der Aufgabenstellung in dieser Publikation war das Herausfiltern von relevanten Komponenten hinsichtlich der vorgegebenen Fragestellung. Die einzelnen Proben einer Untersuchungsreihe werden hierbei nicht isoliert betrachtet, sondern alle zusammen in Abhängigkeit ihrer zeitlichen, räumlichen oder prozessbezogenen Beziehung. Alle Probenkomponenten, die einen vorgegebenen Schwellenwert für Signalintensität überschreiten, werden beim Auswerten des Screenings berücksichtigt. Da sie als mathematische Menge betrachtet werden, ist durch Anwendung der Mengenoperatoren (Vereinigung ($A \cup B$), Durchschnitt ($A \cap B$) und Differenz ($A \setminus B$)) eine schnelle Fokussierung auf für die Fragestellung relevante Komponenten möglich.

Weiter wurde für die Identifizierung von Komponenten das Datenbankkonzept DAIOS vorgestellt. Die Online-Datenbank DAIOS wurde zur Unterstützung der Identifizierung organischer Spurenstoffe in wässrigen Umweltproben konzipiert. Sie besitzt unter anderem zusätzliche Suchoptionen für die Datenbankabfrage (z. B. Precursor- und Fragmentationensuche mit variabler Massentoleranz). Zukünftig soll mit Hilfe von Probeninformationen (z. B. über vorhandene Produktionsbetriebe oder landwirtschaftliche Nutzungen im Umfeld der Probenahmestellen) das Herausfiltern von Substanzen aus der Gesamtheit der Datenbanktreffer bezüglich der Substanzklasse (z. B. Pestizide) oder des Einsatzgebiets (z. B. Landwirtschaft) möglich sein. Infolgedessen können die Datenbanktreffer anhand dieser Informationen klassifiziert und in eine plausible Rangfolge gebracht werden. Außerdem sind die Datenbankeinträge über den sogenannten „Transformationen Tree“ vernetzt. Dadurch wird eine effizientere Datenbankabfrage sowie ein schnelleres Auffinden von Transformationsprodukten identifizierter Kontaminanten gewährleistet.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Deponiesickerwasser auf eine Trinkwasserversorgung wurde mit Hilfe des vorgestellten Auswerteansatzes die Wasserwerks- und Trinkwasserrelevanz der 1729 detektierten Komponenten in einem Schritt ermittelt. Lediglich acht der 1729 Komponenten waren wasserwerksrelevant und nur drei davon konnten nach der Trinkwasseraufbereitung (Ozonung) noch im Trinkwasser nachgewiesen werden. Neben Crotamiton und Carbamazepin wurde im Rohwasser des Wasserwerks noch 1-Adamantylamin identifiziert, welches schließlich auch im Trinkwasser in einem Konzentrationsbereich von 20 ng L^{-1} nachweisbar war. Mehrere nicht erwartete bzw. unbekannte Komponenten der Deponiesickerwasserprobe konnten mit Hilfe der Datenbank DAIOS einer Substanz zugeordnet werden. Die Datenbanktreffer wurden mittels H/D-Austausch-Experimenten und MS/MS-Analysen mit Referenzsubstanzen anschließend verifiziert.

Das Screening auf unbekannte Substanzen und deren Identifizierung vereinfacht sich deutlich, wenn mit Hilfe von Hinweisen und Probeninformationen die Ursache der Kontamination stark eingeschränkt werden kann. Bei dem Beispiel einer auffällig rot gefärbten Wasserprobe aus einem Grundwasserbeobachtungsbrunnen (Kapitel 4, **Publikation II**) lag der Verdacht einer Kontamination des Wassers mit einem oder mehreren Markierungsfarbstoffen nahe. Die

HPTLC/AMD-Trennung der Wasserprobe führte zu sechs fluoreszierenden Banden. Eine der Banden wurde schnell durch den Abgleich der R_f -Werte und UV-Spektren von Referenzsubstanzen dem Markierungsfarbstoff Rhodamin B zugeordnet. Da keine der weiteren fünf Banden einem anderen Markierungsfarbstoff zugeordnet werden konnte, wurden mögliche Abbauprodukte von Rhodamin B als Ursache für die Banden in Betracht gezogen.

Deshalb wurden die Substanzen für weiterführende Untersuchungen von der HPTLC-Platte extrahiert und die Extrakte mittels Nano-Chip-HPLC-QTOF-MS analysiert. Die Full-Scan-Datensätze der Extrakte wurden hinsichtlich in der Literatur beschriebener und durch das „UM-BBD Pathway Prediction System“ (Universität Minnesota) berechneter Abbauprodukte untersucht. In den einzelnen HPTLC-Extrakten konnten Hinweise auf das Vorhandensein von je einem der fünf möglichen de-ethylierten Abbauprodukte gefunden werden. Nach der Identifizierung der Abbauprodukte mittels MS/MS- und Derivatisierungsexperimenten war sogar die eindeutige Zuordnung der einzelnen Banden für die Isomeren N,N-diethylrhodamine und N,N'-diethylrhodamine möglich. Die folgende Quantifizierung von Rhodamin B ($83 \mu\text{g L}^{-1}$) erfolgte mittels HPLC-MS/MS. Erst durch die Kombination der eingesetzten Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplungen war ein schnelles Auffinden von Rhodamin B und dessen de-ethylierten Abbauprodukten als Ursache der Rotfärbung der Wasserprobe möglich.

Das Landesamt für Geologie, Rohstoffe und Bergbau in Freiburg bestätigte auf Anfrage einen Markierungsversuch mit Rhodamin B für das Jahr 1978 im Einzugsbereich des Grundwasserbeobachtungsbrunnens. Somit gelang es bei dieser Untersuchung zum ersten Mal, den bei einem Markierungsversuch eingesetzten Farbstoff Rhodamin B sowie die gebildeten de-ethylierten Abbauprodukte nach über 30 Jahren in der aquatischen Umwelt nachzuweisen.

Bei Untersuchungen der zu Trinkwassergewinnung genutzten Wasserressourcen (Kapitel 11.2, **Publikation V**) wurden die Substanzen 1H-Benzotriazol und Tolyltriazol (Isomerengemisch aus 4- und 5-Methyl-1H-Benzotriazol) als ständige Kontaminanten der Donau ermittelt. 1H-Benzotriazol konnte sogar in 34 % und Tolyltriazol in 18 % der 74 untersuchten Grundwasserbeobachtungsbrunnen nachgewiesen werden. Daraufhin wurden weiterführende Untersuchungen zum Verhalten dieser Substanzen in der Trinkwasseraufbereitung durchgeführt. Nur bei dem Aufarbeitungsschritt der Ozonung war eine signifikante Entfernung der drei Substanzen zu beobachten (vgl. Anhang, Abbildung 11-1).

Deshalb befasst sich der zweite Teil dieser Arbeit (Kapitel 5, **Publikation III**) mit dem Verhalten von 4- und 5-Methyl-1H-Benzotriazol bei der Ozonung. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung lag auf dem Screening und der Identifizierung von Ozonungsnebenprodukten der beiden Ausgangssubstanzen im Laborversuch (Konzentrationsbereich mg L^{-1}) sowie deren anschließender Nachweis im großtechnischen Prozess der Wasseraufbereitung (Konzentrationsbereich ng L^{-1}). Ausgangspunkt des hierfür erarbeiteten Konzepts war die Durchführung von Ozonungs-

experimenten mit Reinsubstanzen im Labormaßstab. Die Reaktionslösungen mit unterschiedlichen Ozonkontaktzeiten wurden mit einem HPLC-QTOF-MS-System hinsichtlich gebildeter Oxidationsnebenprodukte untersucht. Neben dem gezielten Extrahieren von Ionenspuren postulierter Oxidationsnebenprodukte und dem Vergleich von Chromatogrammen (z. B. UV/VIS) der unterschiedlichen Reaktionslösungen erfolgte das Screening auf Ozonungsnebenprodukte mit Hilfe der Abbildung aller detektierten Komponenten in der Heatmap-Darstellung (Kapitel 6, **Publikation IV**). Hierbei sind für die mittels Softwarealgorithmus bestimmten Komponenten der Proben mit unterschiedlicher Ozonkontaktzeit die jeweilige Retentionszeit, exakte Masse und Intensität bekannt. In der zweidimensionalen Heatmap-Darstellung wird dann die Intensität der einzelnen Probenkomponenten farblich codiert dargestellt. Anhand des abgebildeten farblich-codierten zeitabhängigen Intensitätsverlaufs (Abbau-, Zwischenprodukt- oder Bildungskinetik) aller detektierten Komponenten konnten schnell die Reaktionsprodukte visuell herausgefiltert werden.

Für erkannte Oxidationsnebenprodukte wurde die Struktur anschließend anhand MS/MS-, H/D-Austausch- und Derivatisierungsexperimenten unter Verwendung des HPLC-QTOF-MS in Kombination mit der HPTLC/AMD ermittelt. Durch die Laborversuche konnten insgesamt elf Oxidationsnebenprodukte von 4- und 5-Methyl-1H-Benzotriazol identifiziert werden. Da jedoch die Konzentrationen der beiden Ausgangssubstanzen in den Wässern der Trinkwasseraufbereitung deutlich geringer sind als in den Laborversuchen, war für den Nachweis der Reaktionsprodukte im technischen Prozess die Analyse mittels HPLC-MS/MS mit vorhergehender Anreicherung notwendig. Diese Target-Analytik konnte sowohl für identifizierte als auch für nicht identifizierte Reaktionsprodukte anhand der aus den Laborexperimenten gewonnenen Reaktionslösungen optimiert werden. Bei der Untersuchung der Roh- und Prozesswässer im Wasserwerk Langenau war es dann möglich, drei Oxidationsnebenprodukte im Ablauf der Ozonung nachzuweisen. Diese sind jedoch nicht trinkwasserrelevant, da sie weder in den Wasserproben der darauf folgenden Aufarbeitungsschritte noch im Trinkwasser gefunden wurden. Das ausgearbeitete Konzept lässt sich für das Screening auf Oxidationsnebenprodukte aller bekannten Wasserkontaminanten anwenden.

Diese Promotionsarbeit befasst sich mit neuen Strategien zur Durchführung und Auswertung von Non-Target-Screenings. Die Vorteile und Effizienz der beschriebenen Konzepte wurden beispielhaft an Fragestellungen der Trinkwasseraufbereitung und -überwachung aufgezeigt. Sie können aber auch auf andere Bereiche der Umweltanalytik übertragen werden. Die Bedeutung dieser Arbeit für das Non-Target-Screening lässt sich daran erkennen, dass sowohl die in den **Publikationen I, III** und **IV** beschriebenen Vorgehensweisen für das Screening und Identifizieren von unbekannt organischen Spurenstoffen als auch das Datenbankkonzept DAIOS in drei aktuellen BMBF-Forschungsvorhaben (siehe Kapitel 11.1) berücksichtigt wurden und im Zuge dieser Projekte in den nächsten Jahren weiterentwickelt werden.

Außerdem ist das Konzept zur Auswertung des Non-Target-Screenings (**Publikation I**) seit längerer Zeit Bestandteil des Überwachungskonzepts „Multidimensionales Screening“ (siehe Anhang Abbildung 11-2, Weber et al., 2007) im Betriebs- und Forschungslaboratorium. Hierbei werden die Roh-, Prozess- und Trinkwasserproben des Zweckverbands Landeswasserversorgung routinemäßig hinsichtlich bekannter (Target-Screening) und unbekannter Kontaminanten (Non-Target-Screening) sowie deren biologische Wirkung auf Testorganismen, wie *Vibrio fischeri* (Schulz et al., 2008), untersucht. Das Konzept zur Auswertung eines Non-Target-Screenings (**Publikation I**) kam auch schon bei weiteren, jedoch nicht veröffentlichten laborinternen Projekten und mehreren externen Kundenaufträgen erfolgreich zum Einsatz.

Die Stärke des Non-Target-Screenings besteht in der gesamtheitlichen Betrachtung aller detektierten Komponenten und der daraus gewonnenen Erkenntnisse über unerwartete bzw. unbekannte Probenkontaminanten. Allerdings ist nicht die Identifizierung aller detektierten Probenkomponenten das Ziel des Non-Target-Screenings, da dies nicht mit einem angemessenen Arbeits- und Zeitaufwand durchgeführt werden kann. Erst durch den Schritt der Fokussierung auf relevante Probenkomponenten wird die Anzahl an zu identifizierenden Komponenten auf ein praktikables Maß reduziert. Jedoch müssen zur Steigerung der Effektivität sowohl geräte- als auch softwaretechnische Innovationen in den nächsten Jahren erfolgen. Zwar sind bereits heute die Massengenauigkeit und das Auflösungsvermögen modernster Massenspektrometer schon ausreichend hoch genug für das Screening und Identifizieren kleiner Moleküle, aber mit empfindlicheren Analysensystemen könnte verstärkt auf eine Probenanreicherung für das Non-Target-Screening verzichtet werden. Dadurch verringern sich nicht nur der Arbeitsaufwand und die durch die Probenanreicherung hervorgerufene Blindwertproblematik drastisch, sondern auch schwer und nicht anreicherbare Analyten der Proben können dann besser detektiert werden. Für ein effektives Non-Target-Screening wird das Vorhandensein eines Messmodus zur simultanen Generierung von MS- und MS/MS-Daten aller Probenkomponenten an Bedeutung gewinnen, da Fragmentationen bei Datenbankabfragen zunehmend zur Eingrenzung der Datenbanktreffer herangezogen werden (vgl. DAIOS, Kapitel 3, Publikation I oder Massbank, <http://www.massbank.jp/>). Aber auch frei verfügbare Online-Softwaretools wie z. B. MetFrag (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>) verwenden MS/MS-Daten zur Klassifizierung und somit zur Eingrenzung von Datenbanktreffern. Der Algorithmus von MetFrag berechnet aus den Strukturformeln der Datenbanktreffer von KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>) und benutzerspezifischen Datenbanken theoretische Fragmentationen und gleicht diese mit den experimentell ermittelten Fragmentationen ab. Sehr häufig befindet sich heute schon unter den ersten Plätzen der von MetFrag errechneten Rangfolge der Datenbanktreffer die richtige Substanz (Wolf et al., 2010).

Entscheidend für den Durchbruch des Non-Target-Screenings im Laboralltag werden unter anderem die Fortschritte im Bereich der softwareunterstützten Auswertung sein. Heutige

Programme können bei der Berücksichtigung aller in den Rohdatensätzen vorhandenen Probeninformationen schnell an ihre Leistungsgrenzen stoßen. Folglich sind innovative Softwaretools mit schnelleren und besseren Algorithmen zur Extraktion von Komponenten aus den Rohdatensätzen, deren Ergebnisse kaum falsch-positive Befunde enthalten, notwendig. Außerdem sollten diese Programme zudem einen hohen Automatisierungsgrad der Auswertung zulassen und trotz ihrer Komplexität und der Vielzahl an integrierten Softwaretools benutzerfreundlicher sein. Großes Potenzial besitzt auch die Auswertung und Betrachtung der ermittelten Probenkomponenten mittels multivariater statistischer Verfahren (z. B. Hauptkomponentenanalyse), vor allem zur Erkennung von auffälligen Komponenten beim Vergleich vieler unterschiedlicher Proben. Des Weiteren ist es möglich, Probenkomponenten als Transformationsprodukte auf der Grundlage charakteristischer Massendifferenzen bekannter Abbaureaktionen zu identifizieren. Die heute vorhandenen Softwareprogramme für die statistische Auswertung und Bestimmung von Transformationsprodukten wurden überwiegend für die pharmazeutische Industrie konzipiert. Werden diese Programme zukünftig an die Anforderungen der Umweltanalytik (z.B. Berücksichtigung von Transformationsreaktionen der Umwelt) angepasst, kann die Effektivität des Non-Target-Screenings in diesem Bereich noch deutlich gesteigert werden.

Die Standardisierung von Analysendaten bei einem Non-Target-Screening unter Verwendung von internen Standards ist für den Vergleich von Proben unterschiedlicher Analysenserien ein wichtiges Forschungsfeld. Heute wird häufig die Standardisierung der Signalintensität auf einen bzw. wenige interne Standards durch die verwendeten Softwareprogramme unterstützt. Jedoch darf in Frage gestellt werden, ob das Verhalten eines bzw. mehrerer interner Standards auf das Verhalten vieler Komponenten übertragbar ist. Die Möglichkeiten und Grenzen der Standardisierung von Datensätzen des Non-Target-Screenings müssen in zukünftigen Untersuchungen noch ermittelt werden.

Die Durchführung des Non-Target-Screenings ergänzend zu den jetzt schon routinemäßig durchgeführten Target-Screenings ermöglicht eine umfassende Überwachung der zur Trinkwassergewinnung- und aufbereitung genutzten Wässer auf organische Spurenstoffe. Das frühzeitige Erkennen von nicht erwarteten und unbekanntem Kontaminanten in den unterschiedlichen Wasserressourcen ist zur Sicherung der Trinkwasserqualität enorm wichtig. Deshalb wird das Non-Target-Screening zukünftig in der Umweltanalytik bei Überwachungsprogrammen an Bedeutung gewinnen und sich im Laboralltag etablieren.

8 Literaturverzeichnis (Einleitung & Grundlagen)

- Agilent, 2009. Agilent 6200 Series TOF and 6500 Series Q-TOF LC/MS System. Handbuch G3335-90067 v.6, 6. Auflage, Agilent Technologies Inc., USA.
- Ardrey, R.E., 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.
- Atkins, P.W., 2001. Physikalische Chemie. 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Barceló, D., Petrovic, M., 2007. Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: 25 years on. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 2-11.
- Benner, J., Ternes, T.A., 2009. Ozonation of Metoprolol: Elucidation of oxidation pathways and major oxidation products. *Environmental Science & Technology* 43, 5472-5480.
- Bobeldijk, I., Vissers, J. P. C., Kearney, G., Major, H., van Leerdam, J.A., 2001. Screening and identification of unknown contaminants in water with liquid chromatography and quadrupole-orthogonal acceleration-time-of-flight tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 929, 63-74.
- Borchers, U., 2011. Die Revision der Trinkwasserverordnung von 2001 - Was ist neu? (The Revision of the German Drinking Water Ordinance of 2001 - What is new?). *Vom Wasser* 1, 1-10.
- Bruins, A.P., 1998. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 794, 345-357.
- Buckenmaier, S., Vollmer, M., Trojer, L., Emotte, C., 2008. Ultra-high capacity small molecule chips for the quantification of pharmaceuticals using triple-quadrupole mass spectrometry. Application Note Agilent Technologies, Deutschland, Publication Number 5989-7967EN.
- Bulterman, A.-J., Vreuls, J.J., Ghijsen, R.T., Brinkman, U.A.T., 1993. Selective and sensitive detection of organic contaminants in water samples by online trace enrichment-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of High Resolution Chromatography* 16, 397-403.
- Burger, K., 1984. DC-PMD, Dünnschicht-Chromatographie mit Gradienten-Elution im Vergleich zur Säulenflüssigkeits-Chromatographie. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 318, 228-233.

- Burger, K., Jork, H., Köhler, J., 1996. Application of AMD to the determination of crop protection agents in drinking water. Part IV: Fundamentals of a confirmatory test. *Acta hydrochimica et hydrobiologica* 24, 6-15.
- Budzikiewicz, H., Schäfer, M., 2005. *Massenspektrometrie*. 5. Auflage, Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.
- Camel, V., Bermond, A., 1998. The use of ozone and associated oxidation processes in drinking water treatment. *Water Research* 32, 3208-3222.
- Cammann, K., 2001. *Instrumentelle Analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Deutschland.
- Cech, N.B., Enke, C.G., 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionisation fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews* 20, 362-387.
- Cole, R.B., 2000. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 763-772.
- Cordewener, J.H.G., Luykx, D.M.A.M., Frankhuizen, R., Bremer, M.G.E.G., Hooijerink, H., America, A.H.P., 2009. Untargeted LC-Q-TOF mass spectrometry method for the detection of adulterations in skimmed-milk powder. *Journal of Separation Science* 32, 1216-1223.
- Criegee, R., 1975. Mechanism of Ozonolysis. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 14, 745-752.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. *Mass Spectrometry - Principles and applications*. 3. Auflage, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England.
- de la Vigne, U., Jänchen, D.E., Weber, W.H., 1991. Application of high-performance thin-layer chromatography and automated multiple development for the identification and determination of pesticides in water. *Journal of Chromatography A* 553, 489-496.
- de Laeter, J.R., Böhlke, J.K., de Bièvre, P., Hidaka, H., Peiser, H.S., Rosman, K.J.R., 2003. Atomic weights of the elements: Review 2000. *IUPAC, Pure and Applied Chemistry* 75, 683-800.
- DIN 38408 3, 1993. *Gasförmige Bestandteile (Gruppe G) - Bestimmung von Ozon (G3)*. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Fachnormenausschuss Wasserwesen im DIN (Deutsches Institut für Normung) e. V..
- Dole M., Mack L. L., Hines R. L., Mobley R. C., Ferguson L. D., B., A.M., 1968. Molecular Beams of Macroions. *Journal of Chemical Physics* 49, 2240-2249.

- Eberz, G., Rast, H., Burger, K., Kreiss, W., Weisemann, C., 1996. Bioactivity screening by chromatography-bioluminescence coupling. *Chromatographia* 43, 5-9.
- Eichhorn, P., Ferguson, P.L., Pérez, S., Aga, D.S., 2005. Application of ion trap-MS with H/D exchange and QqTOF-MS in the identification of microbial degradates of trimethoprim in nitrifying activated sludge. *Analytical Chemistry* 77, 4176-4184.
- Farré, M.I., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 991-1007.
- Flanagan, R.J., Taylor, A., Watson, I.D., Whelpton, R., 2007. *Fundamentals of analytical toxicology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.
- Fortier, M.-H., Bonneil, E., Goodley, P., Thibault, P., 2005. Integrated microfluidic device for mass spectrometry-based proteomics and its application to biomarker discovery programs. *Analytical Chemistry* 77, 1631-1640.
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., Baldauf, G., Brauch, H.-J., Grohmann, A., Hamsch, B., Huber, S., Huber, W., Kühn, W., Maier, D., Rohmann, U., Scherer, P., Schullerer-Jagiella, S., Steuer, W., Wagner, I., Werner, P., Wricke, B., 1993. *Wasserchemie für Ingenieure*. In: DVGW (Ed.), R.Oldenbourg, München, Deutschland.
- García-Reyes, J.F., Hernando, M.D., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2007. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 828-841.
- Gaskell, S.J., 1997. *Electrospray: Principles and practice*. *Journal of Mass Spectrometry*, 32, 677-688.
- Gey, M.H., 2008. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*. 2. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Deutschland.
- Ghitun, M., Bonneil, E., Fortier, M.-H., Yin, H., Killeen, K., Thibault, P., 2006. Integrated microfluidic devices with enhanced separation performance: Application to phosphoproteome analyses of differentiated cell model systems. *Journal of Separation Science* 29, 1539-1549.
- Groleau, P.E., Desharnais, P., Coté, L., Ayotte, C., 2008. Low LC-MS/MS detection of glycopeptides released from pmol levels of recombinant erythropoietin using nanoflow HPLC-chip electrospray ionization. *Journal of Mass Spectrometry* 43, 924-935.

- Gross, J.H., 2004. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer-Verlag, 1. Auflage, Heidelberg.
- Henderson, W., McIndoe, J.S., 2005. *Mass Spectrometry of inorganic, coordination and organometallic compounds*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, England.
- Hennion, M.-C., 1999. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 856, 3-54.
- Hernández, F., Pozo, Ó.J., Sancho, J.V., López, F.J., Marín, J.M., Ibáñez, M., 2005. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS2 using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24, 596-612.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Gómez, M.J., Malato, O., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2004. Comparative study of analytical methods involving gas chromatography-mass spectrometry after derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of selected endocrine disrupting compounds in wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1047, 129-135.
- Hogenboom, A.C., Niessen, W.M.A., Brinkman, U.A.T., 1998. Rapid target analysis of microcontaminants in water by on-line single-short-column liquid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 794, 201-210.
- Hogenboom, A.C., van Leerdam, J.A., de Voogt, P., 2009. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 510-519.
- Hogendoorn, E.A., Hoogerbrugge, R., Baumann, R.A., Meiring, H.D., de Jong, A.P.J.M., van Zoonen, P., 1996. Screening and analysis of polar pesticides in environmental monitoring programmes by coupled-column liquid chromatography and gas chromatography--mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 754, 49-60.
- Hoigné, J., Bader, H., 1983. Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water - Part 1. *Water Research* 17, 173-183.
- Hoigné, J., 1998. Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes. *The Handbook of environmental chemistry, 5C, Quality and treatment of drinking water II*. Springer-Verlag, Berlin, Deutschland.

- Holleman, A.F., Wiberg, E., 1995. Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Walter de Gruyter, 101. Auflage, Berlin, Deutschland.
- Holm, J.V., Rugge, K., Bjerg, P.L., Christensen, T.H., 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science and Technology* 29 1415-1420.
- Hopfgartner, G., Varesio, E., Tschäppät, V., Grivet, C., Bourgoigne, E., Leuthold, L.A., 2004. Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules. *Journal of Mass Spectrometry* 39, 845-855.
- Huber, M.M., Göbel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., Mcardell, C.S., Ried, A., Siegerist, H., Ternes, T.A., Gunten, U.v., 2005. Oxidation of pharmaceuticals during ozonation of municipal wastewater effluents: A pilot study. *Environmental Science and Technology* 39, 4290-4299.
- Iavarone, A.T., Williams, E.R., 2003. Mechanism of charging and supercharging molecules in electrospray ionization. *Journal of the American Chemical Society* 125, 2319-2327.
- Ibáñez, M., Sancho, J.V., Pozo, O.J., Hernández, F., 2004. Use of quadrupole time-of-flight mass spectrometry in environmental analysis: elucidation of transformation products of triazine herbicides in water after UV exposure. *Analytical Chemistry* 76, 1328-1335.
- Ibáñez, M., Sancho, J.V., Pozo, Ó.J., Hernández, F., 2006. Use of liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry in the elucidation of transformation products and metabolites of pesticides. Diazinon as a case study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 384, 448-457.
- Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., McMillan, D., Rao, R., 2008. Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 481-489.
- Iribarne, J. V., Thomson, B. A., 1976. On the evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics* 64, 2287-2294.
- Jautz, U., Morlock, G., 2006. Efficacy of planar chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry for employment in trace analysis. *Journal of Chromatography A* 1128, 244-250.
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1989. Thin-Layer Chromatography - Reagents and Methods. Band 1a, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.

- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H., 1994. Thin-Layer Chromatography - Reagents and Methods. Band 1b, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Deutschland.
- Kaltenböck, K., 2008. Chromatographie für Einsteiger. 1. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.
- Kebarle, P., 2000. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 35, 804-817.
- Koeppel, C., Tenczer, J., 1995. Scope and limitations of general unknown screening by gas chromatography-mass spectrometry in acute poisoning. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 6, 995-1003.
- Kosjek, T., Heath, E., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 1076-1085.
- Luftmann, H., 2004. A simple device for the extraction of TLC spots: direct coupling with an electrospray mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378, 964-968.
- Martínez Vidal, J.L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Garrido Frenich, A., 2009. Determination of pesticide transformation products: A review of extraction and detection methods. *Journal of Chromatography A* 1216, 6767-6788.
- Maurer, H., Pflieger, K., 1988. Toxicological detection of ajmaline, prajmaline [prajamaliu] and their metabolites in urine integrated in a "general-unknown" analysis procedure using gas chromatography - mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 330, 459-460.
- Mendoza, C.E., 1973. Thin-layer chromatography and enzyme inhibition techniques: Introduction. *Journal of Chromatography* 78, 29-40.
- Metzger, S., 2010. Einsatz von Pulveraktivkohle zur weitergehenden Reinigung von kommunalem Abwasser. Dissertationsschrift TU Berlin, Oldenbourg Industrieverlag München, Deutschland.
- Meyer, V.R., 2009. Praxis der Hochleistungsflüssigchromatographie. 10. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Deutschland.
- Morlock, G., Schwack, W., 2010. Coupling of planar chromatography to mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29, 1157-1171.

- Mortimer, C.E., 2001. Das Basiswissen der Chemie. 7. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Mueller, C.A., Weinmann, W., Dresen, S., Schreiber, A., Gergov, M., 2005. Development of a multi-target screening analysis for 301 drugs using a QTrap liquid chromatography/tandem mass spectrometry system and automated library searching. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1332-1338.
- Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, R., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 659-666.
- Müller, A., Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water. *Water Research*, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.033, accepted.
- Murray, K.K., Boyd, R.K., Eberlin, M.N., Langley, G.J., Li, L., Naito, Y., 2006. Standard definitions of terms relating to mass spectrometry. MS Terms Third Draft, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- Otto, M., 2006. Analytische Chemie. 3. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Deutschland.
- Universität Minnesota, UM-BBD Pathway Prediction System: <http://umbbd.msi.umn.edu/predict/> (Zugriff 12.02.2009).
- Paul, W., Steinwedel, H., 1953. Ein Neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung* 8, 448-450.
- Petrovic, M., Barceló, D., 2006. Application of liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QqTOF-MS) in the environmental analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 41, 1259-1267.
- Pläß, E., 2006. Determination of Amitrol in water by AMD. *CAMAG Bibliography Service* 96, 2-5.
- Rahn, C., Schlenk, H., 1973. Detection of aldehydes with 4-amino-5-hydrazino-1,2,4-triazole-3-thiol as spray reagent. *Lipids* 8, 612-616.

- Rakness, K.L., 2005. Ozone in drinking water treatment: process design, operation, and optimization. American Water Works Association, Denver.
- Reemtsma, T., 2003. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal of Chromatography A* 1000, 477-501.
- Ruck, W.K.L., 1992. Wirkung von Ozon auf die Flockbarkeit gelöster organischer Stoffe aus mechanisch und biologisch geklärtem Abwasser. Dissertation, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft, Universität Stuttgart.
- Saint-Marcoux, F., Lachâtre, G., Marquet, P., 2003. Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid-chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid-chromatography-diode array detection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14, 14-22.
- Sarioglu, H., 2003. Massenspektrometrische Untersuchung posttranslatiöner Modifikationen - Deamidierung als ubiquitäres Phänomen. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland.
- Schmidt, C.K. and Brauch, H.-J., 2008. N,N-Dimethylsulfamide as Precursor for N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Formation upon Ozonation and its Fate During Drinking Water Treatment. *Environmental Science & Technology* 42, 6340-6346.
- Schmidt, T.C., Lutze, H., 2010. Möglichkeiten und Grenzen oxidativer Verfahren in der Wasseraufbereitung. *Vom Wasser* 108, 41-47.
- Schulz, W., Seitz, W., Weiss, S., Weber, W., Böhm, M., Flottmann, D., 2008. Use of *Vibrio fischeri* for screening for bioactivity in water analysis. *JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 21, 427-430.
- Seitz, W., 2007. Occurrence and behaviour of iodinated X-Ray contrast media in drinking and waste water treatment. Dissertation. University of Surrey, United Kingdom.
- Seitz, W., Jiang, J.-Q., Schulz, W., Weber, W.H., Maier, D., Maier, M., 2008. Formation of oxidation by-products of the iodinated X-ray contrast medium iomeprol during ozonation. *Chemosphere* 70, 1238-1246.
- Seitz, W., Schulz, W., Weber, W.H., 2006. Novel applications of highly sensitive liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry for the direct detection of ultra-trace levels of contaminants in water. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 2281-2285.

- Sherma, J., Morlock, G., 2008. Chronology of thin-layer chromatography focusing on instrumental progress. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* 21, 471-477.
- Simpson, N.J.K., 2000. *Solid-Phase Extraction - Principles techniques and applications*. 1. Auflage, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Soler, C., Picó, Y., 2007. Recent trends in liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine pesticides and their metabolites in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 103-115.
- Stahelin, J., Hoigné J., 1985. Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environmental Science and Technology* 19, 1206-1213.
- Stephens, W.E., 1946. A pulsed mass spectrometer with time dispersion. *Physical Review* 69, 691.
- Suarez, S., Dodd, M.C., Omila, F., Gunten, U.v., 2007. Kinetics of triclosan oxidation by aqueous ozone and consequent loss of antibacterial activity: Relevance to municipal wastewater ozonation. *Water Research* 41, 2481-2490.
- Subden, R.E., Brown, R.G., Noble, A.C., 1978. Determination of histamines in wines and musts by reversed-phase high performance chromatography. *Journal of Chromatography* 166, 310-312.
- Thurman, E.M., Mills, M.S., 1998. *Solid-Phase Extraction: Principles and practice*. John Wiley & Sons, New York.
- Thurman, E. M., Ferrer, I., Fernández-Alba, A.R., 2005. Matching unknown empirical formulas to chemical structure using LC/MS TOF accurate mass and database searching: example of unknown pesticides on tomato skins. *Journal of Chromatography A* 1067, 127-134.
- Tolonen, A., Turpeinen, M., Pelkonen, O., 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry in vitro drug metabolite screening. *Drug Discovery Today* 14, 120-133.
- Trinkwasserverordnung, 2001. Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch. *Bundesgesetzblatt I S.*, 959ff.
- Vel Leitner, N.K., Roshani, B., 2010. Kinetic of benzotriazole oxidation by ozone and hydroxyl radical. *Water Research* 44, 2058-2066.
- von Gunten, U., 2003. Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37, 1443-1467.

- Weber, W. H., 1988. Pflanzenschutzmittel und ähnliche Stoffe in Grund- und Trinkwässern: Tendenzen bei der Analytik aus Sicht der chemischen Untersuchungsanstalten. Schriftenreihe des Instituts für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes 79, 183.
- Weber, W.H., Seitz, W., Schulz, W., Wagener, H.-A., 2007. Nachweis der Metaboliten Desphenyl-chloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser. *Vom Wasser* 105, 3-34.
- Weins, C., Jork, H., 1996. Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* 750, 403-407.
- Werner, E., Heilier, J.-F., Ducruix, C., Ezan, E., Junot, C., Tabet, J.-C., 2008. Mass spectrometry for the identification of the discriminating signals from metabolomics: Current status and future trends. *Journal of Chromatography B* 871, 143-163.
- Wilm, M.S., Mann, M., 1994. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 136, 167-180.
- Wippo, U., 2003. Bestimmung von thermolabilen und nichtflüchtigen Pflanzenschutzmittelrückständen in pflanzlichen Lebensmitteln. *Prozesswissenschaften*. Technische Universität Berlin, Deutschland.
- Wiza, J.L., 1979. Microchannel Plate Detectors. *Nuclear Instruments and Methods* 162, 587-601.
- Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M. and Neumann, S., 2010. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11, 148, 1-12.
- Yin, H., Killeen, K., Brennen, R., Sobek, D., Werlich, M., van de Goor, T., 2005. Microfluidic chip for peptide analysis with an integrated HPLC column, Sample enrichment column and nanoelectrospray tip. *Analytical Chemistry* 77, 527-533.

9 Tabellenverzeichnis

9.1 Einleitung

Tabelle 1-1: Auswahl an Begriffen für die unterschiedlichen Vorgehensweisen bei einem Screening	3
Tabelle 2-1: Wechselwirkungen mit den dazugehörigen Bindungsenergien (Hennion, 1999)	9
Tabelle 2-2: Auswahl von Oxidations- und Desinfektionsmittel der Trinkwasseraufbereitung	11
Tabelle 2-3: Exakte Atommasse, nominelle Masse, Molenbruch und Massendefekt von Elementen und ihren Isotopen (de Laeter et al., 2003)	34

9.2 Publikation I

Table 1: Waterworks- and drinking water-relevant substances (grey highlighted) and other identified substances (sorted by mass)	63
--	-----------

9.3 Publikation II

Table 1: Settings of the QTOF mass spectrometer	73
Table 2: Settings of the Triple Quadrupole mass spectrometer	75
Table 3: Rhodamine B and its de-ethylated transformation products	79
Table 4: Calculated concentrations of the de-ethylated transformation products as rhodamine B equivalents	81

9.4 Publikation III

Table 1: Results from the HPLC-QTOF-MS screening of the six oxidation by-products (ESI-)	95
Table 2: Results of the structure elucidation using HPLC-QTOF-MS (ESI-)	97
Table 3: Overview of the product ions of M125, M139, and M165 (with ring cleavage)	98

10 Abbildungsverzeichnis

10.1 Einleitung

Abbildung 1-1: Quellen und Eintragspfade von anthropogenen Substanzen	2
Abbildung 1-2: Vorgehensweisen für das Pre-, Post- und Non-Target-Screening mittels HPLC-MS	4
Abbildung 2-1: Durchführung der SPE (verändert nach Thurman und Mills, 1998)	10
Abbildung 2-2: Mesomere Grenzstrukturen von Ozon (Hoigné, 1998)	11
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Trinkwasseraufbereitung	13
Abbildung 2-4: Klassifizierung nach Art der Phasen (verändert nach Cammann, 2001)	16
Abbildung 2-5: Chromatographische Kenngrößen (verändert nach Meyer, 2009)	18
Abbildung 2-6: Van-Deemter-Kurve (verändert nach Gey, 2008).	20
Abbildung 2-7: Schematische Darstellung eines HPLC-Systems (verändert nach Otto, 2006)	20
Abbildung 2-8: Darstellung des Nano-HPLC-Chips und dessen Funktionsweise	23
Abbildung 2-9: Schematische Darstellung eines Diodenarray-Detektors	24
Abbildung 2-10: Schematischer Ablauf der HPTLC	26
Abbildung 2-11: Auswahl an möglichen Derivatisierungsreaktionen auf der HPTLC-Platte	27
Abbildung 2-12: Schematische Darstellung des Extraktionsstempels	28
Abbildung 2-13: Übersicht der Bestandteile eines Massenspektrometers (verändert nach Sarioglu, 2003)	29
Abbildung 2-14: Schematische Darstellung einer ESI-Quelle mit den darin ablaufenden Prozessen	31
Abbildung 2-15: Vergleich der Modelle zur Ionenbildung bei der ESI (verändert nach Seitz, 2007)	32
Abbildung 2-16: Graphische Darstellung der Auflösung	36
Abbildung 2-17: Schematische Darstellung eines Massenspektrums, des TIC und mehrerer EIC	36
Abbildung 2-18: Schematische Darstellung eines Quadrupols (verändert nach Flanagan et al., 2007)	37
Abbildung 2-19: Stabilitätsdiagramm (verändert nach Henderson und McIndoe, 2005)	38
Abbildung 2-20: Schematische Darstellung der Massentrennung bei einem linearen TOF-MS	39
Abbildung 2-21: Schematische Darstellung eines Reflektron-TOF-MS	42
Abbildung 2-22: Schematische Darstellung eines diskreten Elektronenvervielfachers	44
Abbildung 2-23: Schematische Darstellung eines elektrooptischen Detektors	45
Abbildung 2-24: Schematische Darstellung eines QQQ- und QTOF-MS im MS/MS-Modus	47
Abbildung 11-1: Verhalten der Benzotriazole bei der Aufbereitung im Wasserwerk Langenau (Gemittelte normierte Konzentrationen, Januar 2010, N = 3)	132
Abbildung 11-2: Schema des „multidimensionalen Screenings“ zur Ressourcen und Trinkwasserüberwachung bei der Landeswasserversorgung (Weber et al., 2007)	133

10.2 Publikation I

Figure 1: New approach for non-target screening	54
Figure 2: Venn diagram for samples with a temporal or spatial relationship	56
Figure 3: Schematic overview of the sampling points	58
Figure 4: Venn diagrams for determining substances relevant for the waterworks and drinking water	60
Figure 5: Features in the samples illustrated as mass vs. retention time scatter plots (blank corrected)	61

10.3 Publikation II

Figure 1: Structural formulae of five tracer dyes	71
Figure 2: MS spectra of rhodamine B	74
Figure 3: HPTLC separation of the sample and reference tracer dyes (excitation at 366 nm) <i>Malachite green does not fluoresce under this wavelength. The malachite green spot is marked as a box.</i>	76
Figure 4: Comparison of results of the different detections on the HPTLC plate for the groundwater sample (optimised gradient)	76
Figure 5: EICs of rhodamine B (N,N,N',N'-tetraethylrhodamine) and its de-ethylated transformation products (QTOF-MS)	80

10.4 Publikation III

Figure 1: Concept for the screening and identification of oxidation by-products	92
Figure 2: Decreases in the normalized peak areas of 4- and 5-MBT and total organic carbon (TOC) during the ozonation experiment. Vertical bars represent ranges of the N measurements.	93
Figure 3: Results of the HPTLC-UV/VIS and HPTLC-MS of M165 (4-MBT)	100
Figure 4: Time variation curve for BT, 4- and 5-MBT in the Danube River (Leipheim, Germany) over the year 2010	101
Figure 5: Determination of oxidation by-products M139, M147, and M165 in different process waters of the water purification process	102

10.5 Publikation IV

Bild 1: Schematische Darstellung der Ozonungsversuchsanlage [7]	108
Bild 2: Konturplot eines Datensatzes (A) mit vergrößertem Feature (B)	109
Bild 3: Ausschnitt der Heat-Map (schwarz = hohe Intensität, hellgrau = keine/geringe Intensität)	110
Bild 4: Intensitätsverlauf für die Komponente mit der Masse 147,0432 u (schwarz = hohe Intensität, hellgrau = keine/geringe Intensität)	110
Bild 5: Ausschnitt der Heat-Map von 12-h-Mischproben einer Oberflächengewässerüberwachung (schwarz = hohe Intensität, hellgrau = keine/geringe Intensität)	111

11 Anhang

11.1 Zusammenfassung und Ausblick

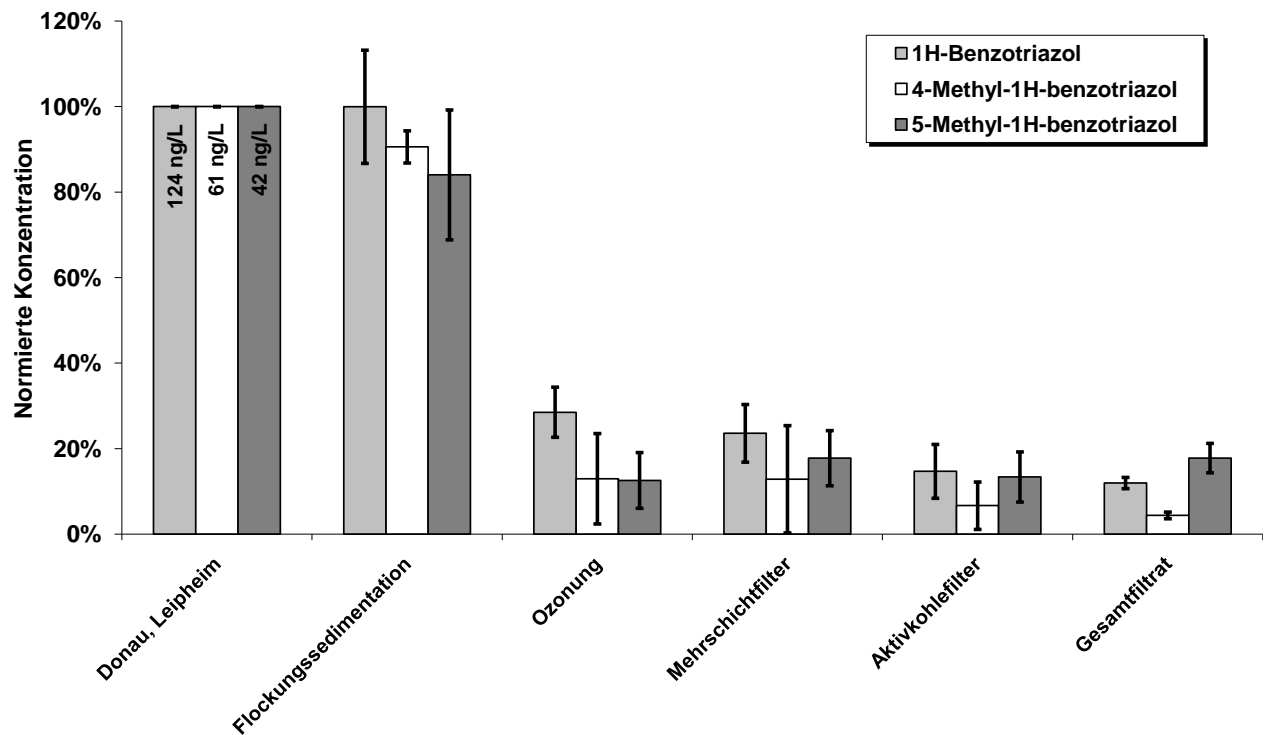


Abbildung 11-1: Verhalten der Benzotriazole bei der Aufbereitung im Wasserwerk Langenau (Gemittelte normierte Konzentrationen, Januar 2010, N = 3)

Vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderte Verbundprojekte

Projekt 1: „Anthropogene Spurenstoffe und Krankheitserreger im urbanen Wasserkreislauf: Bewertung, Barrieren und Risikokommunikation (ASKURIS)“

Projekt 2: „Bewertung bislang nicht identifizierter anthropogener Spurenstoffe sowie Handlungsstrategien zum Risikomanagement im aquatischen System (RISK-IDENT)“

Projekt 3: „Charakterisierung, Kommunikation und Minimierung von Risiken durch neue Schadstoffe und Krankheitserreger im Wasserkreislauf (TransRisk)“

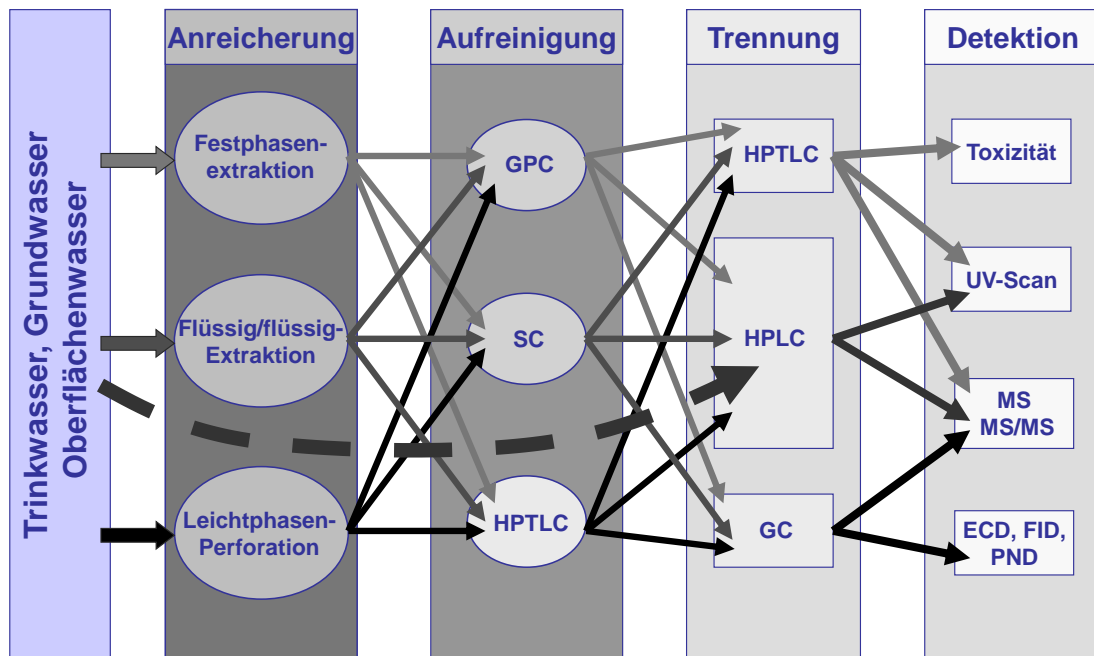


Abbildung 11-2: Schema des „multidimensionalen Screenings“ zur Ressourcen und Trinkwasserüberwachung bei der Landeswasserversorgung (Weber et al., 2007)

GPC = Gelpermeationschromatographie
 TLC = Dünnschichtchromatographie
 GC = Gaschromatographie
 MS = Massenspektrometrie
 ECD = Elektroneneinfangdetektor
 PND = Phosphor-Stickstoff selektiver Detektor

SC = Säulenchromatographie
 HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
 UV/VIS = Wellenlängenbereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts
 MS/MS = Tandem-Massenspektrometrie
 FID = Flammenionisationsdetektor

11.2 Publikation V

Weber, W.H., Müller, A., Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2009. 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt - Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe. Vom Wasser, 107, 16-24.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt - Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe -

Dr. Walter H. Weber*

Dipl.-Ing. (FH) Alexander Müller

Dipl.-Ing. (FH) Stefan C. Weiss

Dr. Wolfram Seitz

Dr. Wolfgang Schulz

Zweckverband Landeswasserversorgung,
Betriebs- und Forschungslaboratorium,
Am Spitzigen Berg 1,
89129 Langenau
E-Mail: weber.w@lw-online.de

* Korrespondenzautor

Schlagwörter

Spurenanalytik, Korrosionsschutzmittel, Grundwasser, Oberflächenwasser, Abwasser, Nano-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie, Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie

Keywords

Trace analysis, corrosion inhibitor, ground water, surface water, waste water, nano-high performance liquid chromatography, high performance thin-layer chromatography, mass spectrometry

Zusammenfassung

Das Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbandes Landeswasserversorgung (LW) nutzt u.a. die Hochleistungsdünnschichtchromatographie (HPTLC) in Form der automatisierten Mehrfachentwicklung (AMD) und die Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Nano-HPLC) mit Flugzeitmassenspektrometrie (TOF-MS) im Rahmen eines multidimensionalen Screenings für eine möglichst umfassende Vorfeldanalytik. Hierbei konnte in Grund- und Abwasser aus dem Wasserschutzgebiet „Donauried-Hürbe“ sowie in Oberflächengewässern dieser Region das Vorkommen von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen, die vorwiegend als Korrosionsschutzmittel Anwendung finden, nachgewiesen werden.

In 34 % der Proben (N = 74) wurden 1H-Benzotriazol mit maximal 173 ng/L und in 18 % der Proben die Tolyltriazole mit maximal 75 ng/L bestimmt. Die Konzentrationen in der Donau sowie in einigen ihrer Zuflüsse im Raum Ulm lagen zwischen 100 und 500 ng/L. In Kläranlagenabläufen, die als Haupteintragsquellen der Substanzen in die Umwelt angesehen werden können, waren die ermittelten Konzentrationen von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen meist kleiner 10.000 ng/L. Im weiteren Verlauf von den Kläranlagen über die Oberflächengewässer bis hin zum Grundwasser verschiebt sich das Verhältnis der beiden Substanzen zugunsten von 1H-Benzotriazol.

Abstract

“1H-Benzotriazole and tolyltriazoles in the aquatic environment - Occurrence in ground, surface and waste water”

The Laboratory for Operation Control and Research of the Zweckverband Landeswasserversorgung (LW) applies high performance thin-layer chromatography (HPTLC) in form of automated multiple development (AMD) and nano-high performance liquid chromatography (Nano-HPLC) with time-of-flight mass spectrometry (TOF-MS) for the multidimensional screening to achieve a comprehensive surveillance as far as possible. The occurrence of the corrosion inhibitors 1H-benzotriazole and tolyltriazoles could be identified for ground and waste water from the water protection area “Donauried-Hürbe” as well as for surface water of this region.

In 34 % of the samples (N = 74) 1H-benzotriazole was detected at the maximum concentration of 173 ng/L and in 18 % of the samples tolyltriazoles with 75 ng/L at the maximum. The concentrations in the Danube as well as in some of its tributaries in the region of Ulm varied between 100 and 500 ng/L. The concentrations of 1H-benzotriazole and tolyltriazoles in the effluent of waste water treatment plants, which can be considered as the main sources of the compounds, were mostly below 10,000 ng/L. In the further course, from waste water to surface

water to ground water, the concentration ratio of the two substances changes in favour of 1H-benzotriazole.

1 Einleitung

Die zunehmende Verstädterung ist häufig mit wachsenden Umweltproblemen verbunden. Kommunales und industrielles Abwasser sowie städtisches Oberflächenablaufwasser tragen zur Verschmutzung der als Vorfluter genutzten Gewässer bei. Auf diese Weise gelangt eine Vielzahl anthropogener Stoffe in die aquatische Umwelt. Das Vorkommen von organischen Spurenstoffen im Wasserkreislauf und damit potenziell auch in den Rohwasserressourcen der Trinkwasserversorger steht seit vielen Jahren in der Diskussion. Aus diesem Grund ist es notwendig, über leistungsfähige analytische Verfahren und Strategien zur Überwachung bekannter als auch unbekannter bzw. noch nicht berücksichtigter Kontaminanten zu verfügen.

Im Betriebs- und Forschungslaboratorium des Zweckverbandes Landeswasserversorgung (LW) wird zur Erkennung von organischen Kontaminanten ein „multidimensionales Screening“ eingesetzt [1]. Hierbei wird die Gaschromatographie (GC) mit den beiden flüssigkeitschromatographischen Methoden [Hochleistungs-Planarchromatographie in Form der HPTLC/AMD [2] und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)] kombiniert. Zur Detektion werden nicht nur physikalisch-chemische Detektoren (wie z. B. UV- oder Massenspektrometer) verwendet, sondern auch biologische Testverfahren, wie der Leuchtbakterientest nach HPTLC/AMD [3]. Das „multidimensionale Screening“ konnte bereits erfolgreich zur Identifikation von Desphenyl-chloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon eingesetzt werden [1].

Im aktuellen Fall ist es gelungen, in Grund-, Oberflächen- und Abwasser bisher nicht berücksichtigte Substanzen zu erkennen, diese als Benzotriazole zu identifizieren und letztlich auch zu quantifizieren. Es handelt sich um 1H-Benzotriazol (CAS 95-14-7, molare Masse 119,1 g/mol) sowie um zwei Tolyltriazole (CAS 64665-57-2, molare Masse 133,2 g/mol) als Isomerengemisch bestehend aus 4-Methyl-1H-benzotriazol (CAS 29878-31-7) und 5-Methyl-1H-benzotriazol (CAS 136-85-6) (Bild 1).

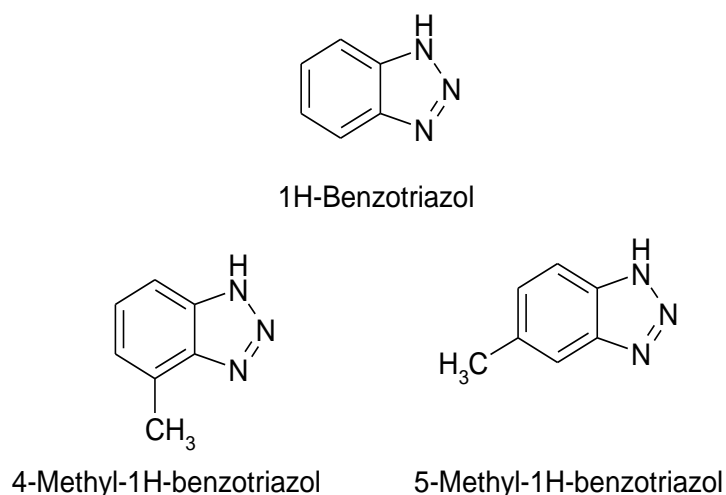


Bild 1: Strukturformeln von 1H-Benzotriazol sowie der Tolyltriazol-Isomere (4-Methyl-1H-benzotriazol und 5-Methyl-1H-benzotriazol)

Kontaminationen mit Benzotriazolen dürften in erster Linie durch ihren Einsatz in Farben und Lacken als Korrosionsschutzmittel [4] für Kupfer und dessen Legierungen, in Kühlflüssigkeiten und Schmierstoffen von Motoren sowie zum Silberschutz in Reinigungs- und Spülmitteln verursacht sein. Weiterhin gelangen sie nach ihrer Verwendung in Frostschutz- und Flugzeugenteisungsmitteln in die Umwelt. Eine untergeordnete Eintragsquelle von Benzotriazolen ist ihr Einsatz als UV-Lichtstabilisator von Kunststoffen und als Schutzmittel vor Schleierbildung bei fotografischen Entwicklungsprozessen.

Zum Vorkommen der Substanzen in der aquatischen Umwelt wurden bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt. Ende der 1990er Jahre konnten in einem Grundwasserüberwachungspegel eines großen nordamerikanischen Flughafens Benzotriazole im mg/L-Bereich nachgewiesen werden. Die Proben zeigten Bioaktivität im Mikrotox-Test (*Vibrio fischeri*) [5].

In einem Berliner Rohabwasser betragen die Mediankonzentrationen 12.000 ng/L 1H-Benzotriazol, 2.100 ng/L 4-Methyl-1H-benzotriazol und 1.300 ng/L 5-Methyl-1H-benzotriazol [6]. Die Ablaufkonzentrationen verschiedener Schweizer Kläranlagen für Benzotriazole lagen zwischen kleiner als 10.000 ng/L bis 100.000 ng/L [7].

Die Konzentrationen von 1H-Benzotriazol in sieben untersuchten Fließgewässern in der Schweiz betragen bis zu 6.300 ng/L und ca. 1.200 ng/L im Greifensee, 100 - 400 ng/L im Zürichsee und 200 ng/L im Genfer See. Im Winter beobachtete Frachtspitzen von 1H-Benzotriazol in dem Schweizer Fluss Glatt wurden auf den Einfluss des nahe gelegenen Züricher Flughafens zurückgeführt [8]. Die ermittelten Konzentrationen im Fluss Glatt lagen zwischen 640 und 3.690 ng/L für 1H-Benzotriazol und zwischen 120 und 630 ng/L für die Tolyltriazole [7].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass 1H-Benzotriazol und die Tolyltriazole zu den am häufigsten und in verhältnismässig hohen Konzentrationen gefundenen Umweltchemikalien in

Fliessgewässern gehören. So wurde 1H-Benzotriazol in 94 % und Tolyltriazole in 81 % aller untersuchten Proben nachgewiesen. Die Mediankonzentrationen betragen 230 ng/L für 1H-Benzotriazol bzw. 140 ng/L für die Tolyltriazole [9].

Anhand des Vergleichs von Zu- und Ablaufkonzentrationen einer kommunalen Kläranlage wurde abgeleitet, dass die genannten Benzotriazole eine schlechte biologische Abbaubarkeit aufweisen. Auch durch den Einsatz eines Membranbioreaktors waren Benzotriazole nicht vollständig aus dem Abwasser zu entfernen. Zudem konnte in Laborversuchen gezeigt werden, dass sich das Abbauverhalten der Tolyltriazol-Isomere signifikant unterscheidet. 5-Methyl-1H-benzotriazol war vollständig und 4-Methyl-1H-benzotriazol deutlich schlechter biologisch abbaubar [10, 11].

Die aquatische Toxizität von 1H-Benzotriazol, der Tolyltriazol-Isomere sowie von 5-Butyl-1H-benzotriazol, einem weiteren Benzotriazol-Derivat, wurde in einer Studie mit den Organismen *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterien), *Pimephales promelas* (Elritze) und *Ceriodaphnia dubia* (Wasserflöhe) verglichen. Das Ansprechen der verschiedenen Organismen auf die getesteten Substanzen variierte über zwei Zehnerpotenzen. *Vibrio fischeri* zeigte eine höhere Empfindlichkeit als die beiden anderen Organismen [12].

Benzotriazole lassen sich nach Flüssigkeitschromatographie mittels tandem-massen-spektrometrischer Detektion nachweisen. Die Bestimmungsgrenzen nach Anreicherung durch Festphasen-Extraktion betragen 10 ng/L für Grundwasser und 25 ng/L für Rohabwasser [13].

Der vorliegende Beitrag beschreibt das Screening auf organische Kontaminanten in Wasserproben und den kombinierten Einsatz verschiedener analytischer Verfahren zur Erkennung, Identifizierung und Quantifizierung der Substanzen am Beispiel von 1H-Benzotriazol bzw. der Tolyltriazole. Zudem werden neue Untersuchungsergebnisse zum Vorkommen der Benzotriazole in Abwässern auch kleinerer Kläranlagen, in der Donau sowie in Grundwasserbeobachtungsbrunnen vorgestellt.

2 Methodik

2.1 Chemikalien, Hilfsstoffe und Geräte

1H-Benzotriazol und eine Mischung der Methyl-1H-benzotriazole (Tolyltriazole: 36 % 4-Methyl-1H-benzotriazol und 64 % 5-Methyl-1H-benzotriazol) wurden von der Fa. Dr. Ehrenstorfer (Augsburg), 4-Methyl-1H-benzotriazol von der Fa. Chemos (Regenstauf) und 5-Methyl-1H-benzotriazol von der Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Das Verhältnis der Methyl-1H-benzotriazol-Isomere in der käuflichen Mischung konnte über die Einzelverbindungen als die Referenzmaterialien ermittelt werden. Das für die Analytik verwendete Wasser wurde aus deionisiertem Wasser mit Hilfe einer MilliQ-Anlage (Fa. Millipore, Schwalbach) aufbereitet. 2-

Propanol, Aceton, Methanol, n-Hexan, Ameisensäure, Ammoniumcarbonat und Schwefelsäure waren Produkte der Fa. Merck (Darmstadt). Als Sorbens wurde Isolute ENV+ von der Fa. Biotage (Grenzach-Wyhlen) verwendet und für die HPTLC kamen LiChrospher-Platten von der Fa. Merck (Darmstadt) zum Einsatz. Für die Flüssigkeitschromatographie wurde eine Zorbax Eclipse-Säule, 50 x 4,6 mm, 1,8 µm, der Fa. Agilent (Waldbronn) benutzt.

Für die Planarchromatographie fanden folgende Geräte von der Fa. Camag (Muttens, Schweiz) Anwendung: Plattenheizer, Auftragesystem ATS 4, Entwicklungssystem AMD 2, TLC Scanner 3 und TLC Visualizer. Zur Extraktion von Substanzen von der HPTLC-Platte kamen die Extraktionsapparatur ChromXtractor (Fa. ChromAn, Leipzig) sowie das TLC-MS-Interface (Fa. Camag, Muttens, Schweiz) zum Einsatz.

Das Nano-HPLC-System (1200 Series) der Fa Agilent (Waldbronn) bestand aus einer Kapillarpumpe (G1376A), Nano-Pumpe (G2226A), zwei Entgasereinheiten (G1379B), einem automatischen Probengeber (G1377A) mit Thermostat (G1330B) und einem HPLC-Chip-Cube (G4240A). Für die chromatographische Trennung wurde ein HPLC-Chip (G4240-65001) mit 40 nL Anreicherungs- und 160 nL Analysensäule (75 x 50 µm, 43 mm Länge) sowie Zorbax 80SB-C18 (5 µm) als Packungsmaterial verwendet. Das Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer 6520 QTOF war von der Fa. Agilent (Waldbronn).

Weiterhin kamen die HPLC-Systeme der Serie 1100 bzw. 1200 von der Fa. Agilent (Waldbronn) sowie die Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 4000 Qtrap bzw. API 5000 von der Fa. Applied Biosystems (Darmstadt) zum Einsatz.

2.2 SPE-Anreicherung und Screening mittels Hochleistungs-Planarchromatographie durch automatisierte Mehrfachentwicklung (HPTLC/AMD)

Die Anreicherung erfolgte mittels Festphasen-Extraktion (SPE) unter Verwendung des Sorbens Isolute ENV+ (200 mg) bei einem pH-Wert von 3 [angesäuert mit Schwefelsäure (konz.)] bzw. 7 [eingestellt mit Natronlauge (1 mol/L) bzw. Schwefelsäure (25 %)]. Konditioniert wurde das SPE-Material aufeinander folgend mit jeweils 6 mL n-Hexan, Aceton, Methanol und Wasser (pH = 3 bzw. 7). Das Probenvolumen betrug 100 mL, die Elution erfolgte nach Trocknung mit 6 mL Methanol und der Abdampfrückstand wurde in 200 µL Methanol aufgenommen.

Zur Chromatographie mittels HPTLC kamen in 2-Propanol vorgereinigte und anschließend für 30 min bei 120 °C in einem Plattenheizer getrocknete LiChrospher-Platten zur Anwendung. Jeweils 30 µL der Extrakte wurden auf eine HPTLC-Platte flächenförmig (6 x 3 mm) aufgetragen (ATS 4). Die Mehrfachentwicklung der Platte erfolgte automatisiert mit dem System AMD 2. Es kam ein Gradient mit 25 Stufen bestehend aus Acetonitril (0,1 % Ameisensäure), Dichlormethan und n-Hexan (Bild 2) zum Einsatz; die Laufstrecke betrug 80 mm.

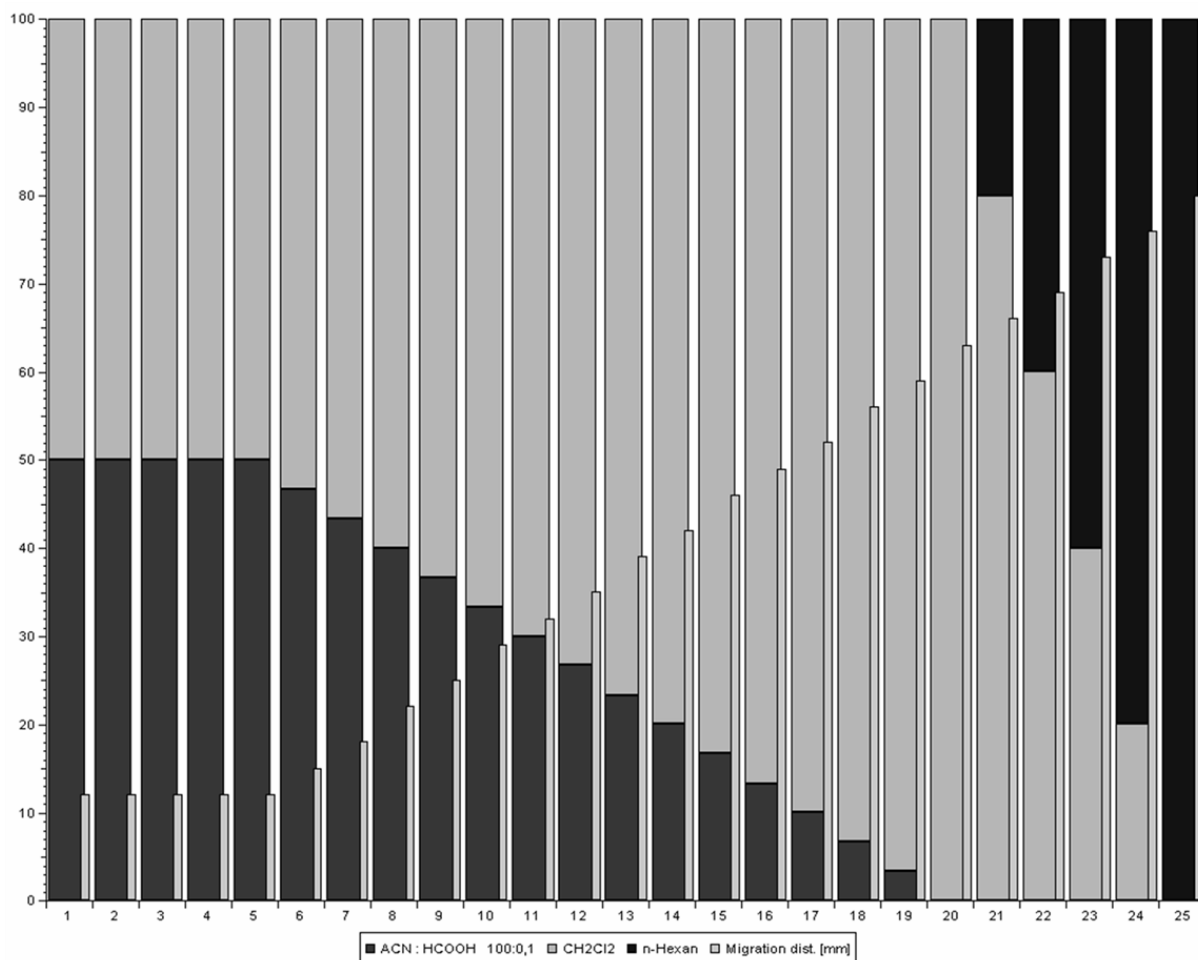


Bild 2: HPTLC/AMD2-Gradient mit 25 Stufen
 - isokratisch beginnend mit 5 Stufen Acetonitril/Dichlormethan (50 : 50) zur Fokussierung,
 - gefolgt von 15 Stufen von Acetonitril/Dichlormethan (50 : 50) zu 100 % Dichlormethan und
 - anschließend von Dichlormethan/n-Hexan (80 : 20) in 5 Stufen zu 100 % n-Hexan.

Die Detektion erfolgte im Mehrwellenlängenscan durch Messung der UV-Absorption bei den Wellenlängen 190, 200, 220, 240, 260, 280 und 300 nm (TLC Scanner 3) sowie durch Aufnahme der Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und der Eigenfluoreszenz bei 366 nm (TLC Visualizer).

Mit Hilfe der Extraktionsapparatur (Fa. ChromAn) bzw. des TLC-MS-Interface (Fa. Camag, Bild 3) gelang der Transfer der Substanzen von der HPTLC-Platte zum Massenspektrometer. Hierbei wurde der zu extrahierende Bereich mit einer Ringschneide abgedichtet und mittels Eluent extrahiert. Die Extraktion erfolgte mit einer Mischung aus Methanol und Wasser [50 : 50 (v/v)] und einem Zusatz von 5 mmol/L Ammoniumacetat bei einer Flussrate von 0,2 mL/min. Die Kopplung des TLC-MS-Interface an das Massenspektrometer erfolgte sowohl online als auch offline.

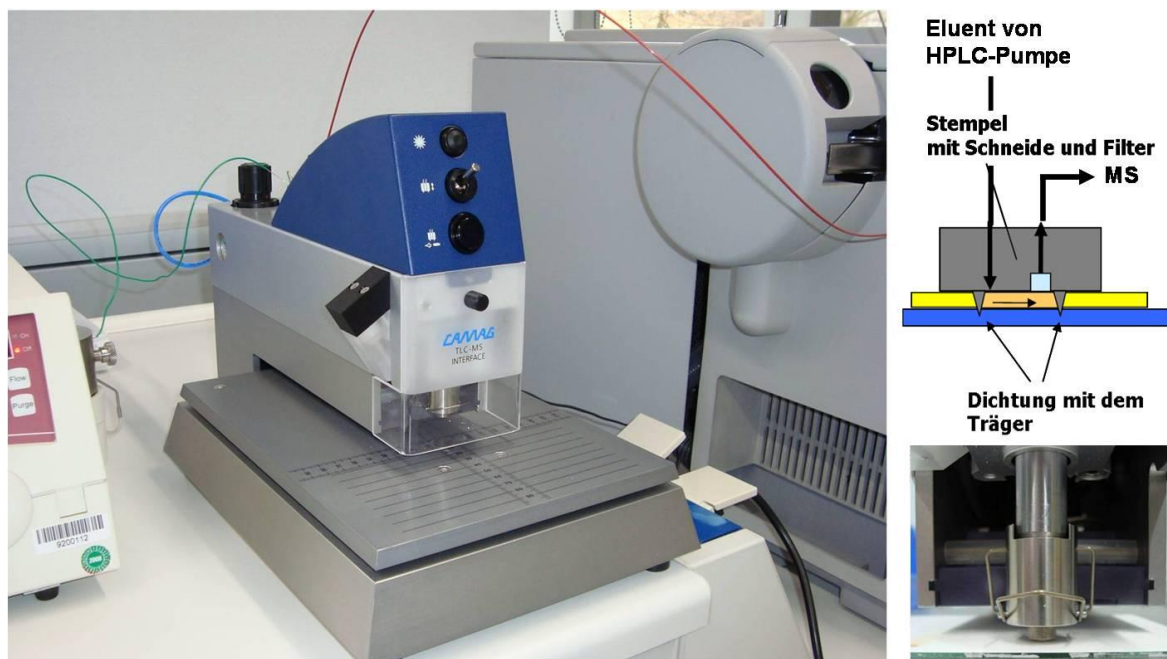


Bild 3: TLC-MS-Interface der Firma Camag

2.3 Screening und Verifikation mittels Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometrie (QTOF-MS)

Die Flüssigkeitschromatographie erfolgte mittels einer Nano-HPLC, wobei die Aufgabe der über $0,45\ \mu\text{m}$ filtrierten Wasserprobe (Injektionsvolumen: max. $8\ \mu\text{L}$) auf die Anreicherungssäule und deren Anreicherung bei $4\ \mu\text{L}/\text{min}$ mit 100 % Wasser ohne Zusatz durchgeführt wurde. Die analytische Flussrate betrug $0,4\ \mu\text{L}/\text{min}$ und der Gradient bestand aus Wasser mit $5\ \text{mmol}/\text{L}$ Ammoniumacetat (A) und Acetonitril mit $5\ \text{mmol}/\text{L}$ Ammoniumacetat sowie 5 % (v/v) Wasser (B). Der Gradient ist in der Tabelle 1 aufgelistet.

Das HPLC-System war mit einem Quadrupol-Time-of-Flight-Massenspektrometer (6520 Q-TOF) gekoppelt. Die Ionisation erfolgte im positiven Modus bei einer Kapillarspannung von $1850\ \text{V}$ und Fragmentorspannung von $200\ \text{V}$. Als Referenzmassen dienen $m/z = 121.0509$ und 922.0098 . Aufgenommen wurden Spektren im MS- und MS/MS-Modus im Bereich $m/z = 50$ bis 1000 .

2.4 Bestimmung von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen mittels anreicherungsfreier LC-MS/MS

Die Bestimmung von 1H-Benzotriazol und der Tolyltriazol-Isomere 4-Methyl-1H-benzotriazol bzw. 5-Methyl-1H-benzotriazol mittels LC-MS/MS erfolgte anreicherungsfrei durch Injektion der über $0,45\ \mu\text{m}$ filtrierten Wasserprobe (Injektionsvolumen: $100\ \mu\text{L}$) in das Analysensystem. Die Trennung der Substanzen gelang flüssigkeitschromatographisch (Fa. Agilent, Waldbronn, 1200

Serie Rapid Resolution) unter Verwendung der Trennsäule Zorbax Eclipse mit den Eluenten Wasser (A) und Methanol (B) jeweils mit einem Zusatz von 1 mL/L Ameisensäure (Standardmethode). Der Gradient umfasste folgende Schritte: 5 min isokratische Elution mit 40 % B, in 2 min von 40 auf 80 % B, 3 min bei 80 % B und 4 min Equilibrationszeit bei 40 % B. Die Flussrate war 0,6 mL/min und die Temperatur des Säulenofens lag bei 25 °C. Die Retentionszeiten betragen 2,5 min für 1H-Benzotriazol, 4,6 min für 4-Methyl-1H-benzotriazol und 4,4 min für 5-Methyl-1H-benzotriazol.

Alternativ erfolgte die Trennung mit den Eluenten Wasser (A) und Methanol (B) jeweils mit einem Zusatz von 2 mmol/L Ammoniumcarbonat (optimierte Trennung der Tolyltriazol-Isomere): 5 min isokratische Elution mit 25 % B, in 2 min von 25 auf 80 % B, 3 min bei 80 % B und 4 min Equilibrationszeit bei 25 % B. Die Flussrate war 0,6 mL/min und die Temperatur des Säulenofens lag bei 25 °C. Die Retentionszeiten betragen 2,4 min für 1H-Benzotriazol, 6,6 min für 4-Methyl-1H-benzotriazol und 7,5 min für 5-Methyl-1H-benzotriazol.

Zur Detektion wurde das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer API 5000 (Applied Biosystems, Darmstadt) mit Elektrospray-Ionisation im positiven Modus eingesetzt. Die Einstellungen der Ionenquelle waren: Temperatur 600 °C, Curtain Gas 30 psi, Gas 1 65 psi, Gas 2 45 psi, CAD 10, Spannung 5000 V und Interface Heater „On“. Die folgenden Massenübergänge wurden zur Detektion herangezogen: $m/z = 120 > 65$ und $120 > 39$ für 1H-Benzotriazol sowie $m/z = 134 > 79$ und $134 > 77$ für die Tolyltriazol-Isomere.

Die quantitative Auswertung erfolgte mittels externer Kalibrierung, wobei die Beeinflussung der Messung durch Matrixbestandteile mit Hilfe von Aufstockungen kontrolliert wurde. Die Aufstockungen betragen 100 ng/L für Grund- und Trinkwässer, 500 ng/L für Oberflächengewässer und 5000 ng/L für Abwässer. Es fand keine Korrektur statt, da die ermittelten Wiederfindungsraten zwischen ca. 80 und 120 % lagen. Die Nachweisgrenzen (Standardmethode) waren 5 ng/L für 1H-Benzotriazol und 2,4 ng/L für Tolyltriazole und die Bestimmungsgrenzen (Standardmethode) 14 ng/L für 1H-Benzotriazol und 5,9 ng/L für Tolyltriazole. Diese wurden entsprechend des Kalibrierverfahrens nach DIN 32645 unter Verwendung von Grundwasser ermittelt.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungskonzept der Landeswasserversorgung (LW)

Im Rahmen eines Überwachungsprogramms der von der LW genutzten Rohwässer und deren Umfeld (z. B. Vorfeldmessstellen, Oberflächengewässer und Kläranlagenabläufe) wurden neben den umfassenden und regelmäßig durchgeführten chemischen, chemisch-physikalischen sowie mikrobiologischen Untersuchungen zusätzlich „Non-Target-Screening-Verfahren“ zur Erkennung von bisher nicht berücksichtigten Kontaminanten oder unbekanntem Substanzen durchgeführt.

Hierbei kam u.a. ein Screening mittels HPTLC/AMD [2] zum Einsatz. Dabei konnte festgestellt werden, dass sowohl in Extrakten von Kläranlagenabläufen als auch von Oberflächen- und Grundwasserproben Peaks auftraten (Bild 4), die im Rahmen der bei der LW bisher durchgeführten Target-Analytik-Untersuchungen nicht zugeordnet werden konnten.

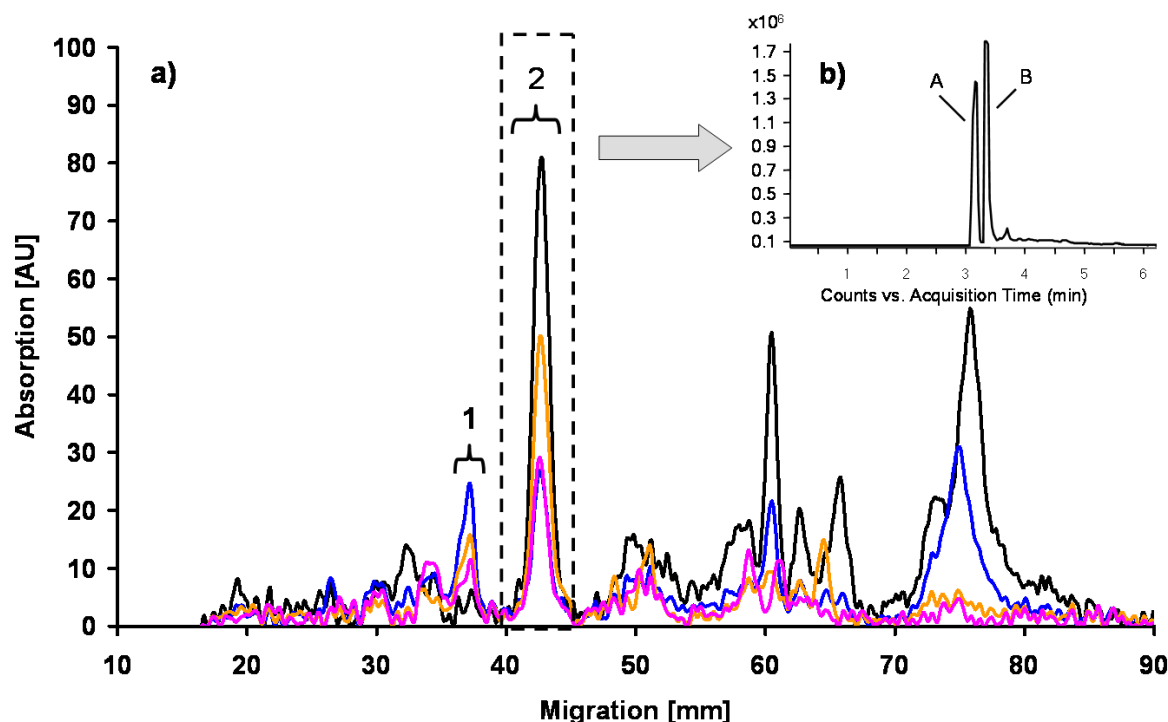


Bild 4: a) HPTLC/AMD-UV/VIS-Chromatogramm eines Kläranlagenablauf-Extraktes [Mehrwellenlängen-Scan (Absorptionsmessung bei 190 - 300 nm)]
 b) Nano-LC/QTOF-MS-Chromatogramm der extrahierten Substanzen,
 Peak A: 1H-Benzotriazol; Peak B: Tolyltriazole

Deshalb wurde zur Identifikation dieser bisher nicht berücksichtigten Kontaminanten zunächst die den Peak 2 (Bild 4) bildende organische Substanz mit Hilfe der in Bild 3 dargestellten Extraktionsapparatur (TLC-MS-Interface) von der HPTLC-Platte extrahiert und nach Nano-LC mittels QTOF-MS untersucht (ESI⁺). Dabei konnten zwei intensive Peaks (Peak A bei RT = 3.2 min und Peak B bei RT = 3.4 min) erkannt werden.

Zur Identifizierung der den beiden Peaks zuzuordnenden Substanzen wurde eine im Betriebs- und Forschungslaboratorium der LW erstellte Substanzdatenbank (ca. 300 Einträge) mit den jeweiligen Summenformeln und exakten Massen von in der Literatur beschriebenen potenziellen Umweltkontaminanten eingesetzt.

Mit Hilfe dieser Datenbankabfrage war es anhand der bestimmten exakten Molekülmasse als auch über das Isotopenmuster möglich, Peak A als 1H-Benzotriazol zu bestimmen und Peak B den Tolyltriazolen (4-Methyl-1H-benzotriazol bzw. 5-Methyl-1H-benzotriazol) zuzuordnen. Eine

Unterscheidung der Tolyltriazol-Isomere konnte unter den gewählten Nano-LC-Bedingungen nicht erfolgen, da diese chromatographisch nicht getrennt werden konnten.

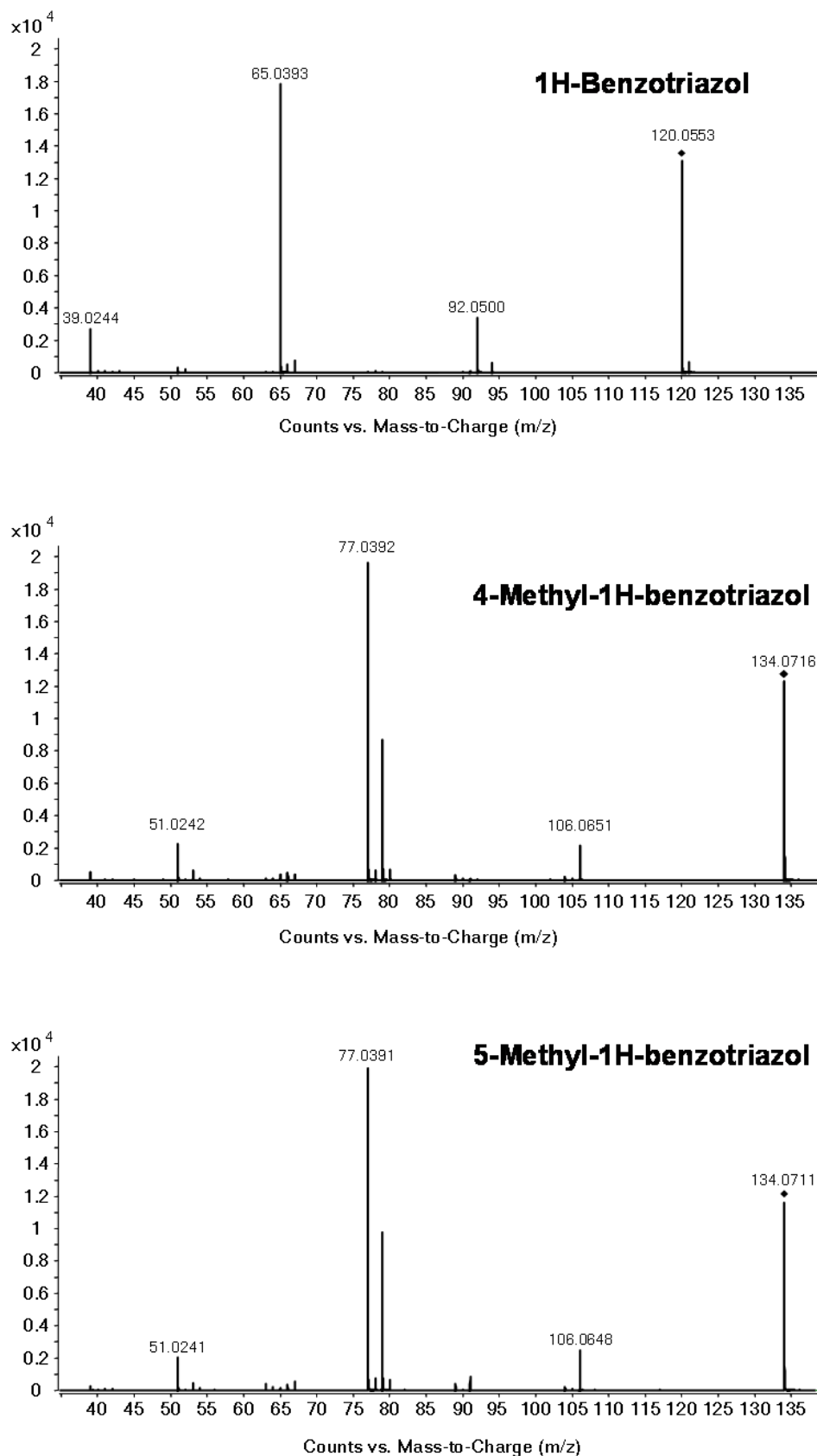


Bild 5: MS/MS-Spektren von 1H-Benzotriazol sowie Tolyltriazolen aufgenommen mittels Nano-LC/QTOF-MS nach Extraktion von der HPTLC-Platte

Zur Bestätigung der Identität wurden Produktionenspektren (MS/MS) der von der HPTLC-Platte extrahierten Substanzbande nach Trennung mit der Nano-LC aufgenommen (Bild 5) und mit kommerziell erhältlichem Referenzmaterial verglichen. Sowohl die Retentionszeiten als auch die Massenspektren stimmten gut überein. Zudem zeigte sich, dass die Produktionenspektren der Tolyltriazol-Isomere nahezu identisch sind.

Als zusätzliche Bestätigung wird in Bild 6 die Migration der Referenzsubstanzen im Vergleich zu den Extrakten unterschiedlicher Kläranlagenausläufe bei der HPTLC/AMD gezeigt.

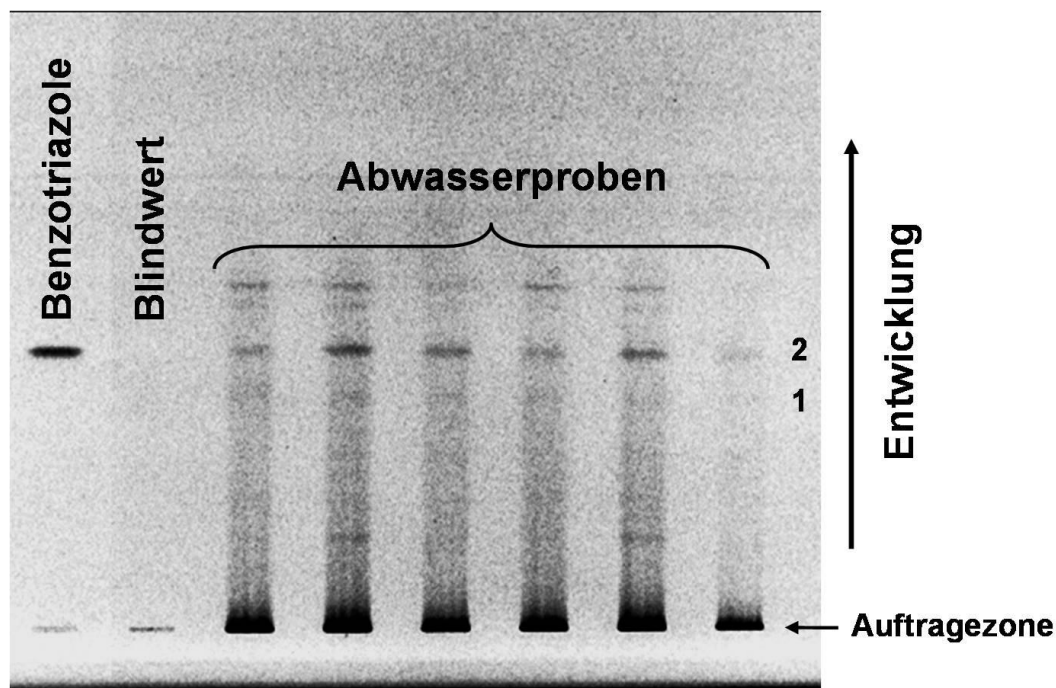


Bild 6: HPTLC/AMD-Trennungen von Festphasen-Extrakten unterschiedlicher Kläranlagen-abläufe sowie den Referenzen von 1H-Benzotriazol und den Tolyltriazolen (Fluoreszenzlöschung, Anregungswellenlänge: 254 nm)

3.2 Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser

Das Wasserschutzgebiet Donauried-Hürbe - mit einer Fläche von 517 km² - umfasst das gesamte Einzugsgebiet der Fassungen des Zweckverbandes Landeswasserversorgung (Bild 7). Die Zone II ist mit 52 km² eine der größten engeren Schutzzonen in Deutschland. Im erweiterten Schutzgebiet liegen 56 Ortschaften mit rund 5,7 km² Gewerbefläche. Es gibt 19 Kläranlagen, 95 Regenüberlaufbecken sowie ca. 450 km öffentliche und 900 km private Abwasserrohre. Das Straßennetz hat eine Länge von 528 km, wovon 28 km als Autobahnen ausgebaut wurden. Aktuell sind 356 Altlasten erfasst, die meisten davon sind nicht sanierungsbedürftig. Auf rund der Hälfte der Fläche wird Ackerbau betrieben. Im Schutzgebiet entspringen die Flüsschen Nau, Lone und Hürbe. Rund 20 weitere Gräben durchziehen das Gebiet.

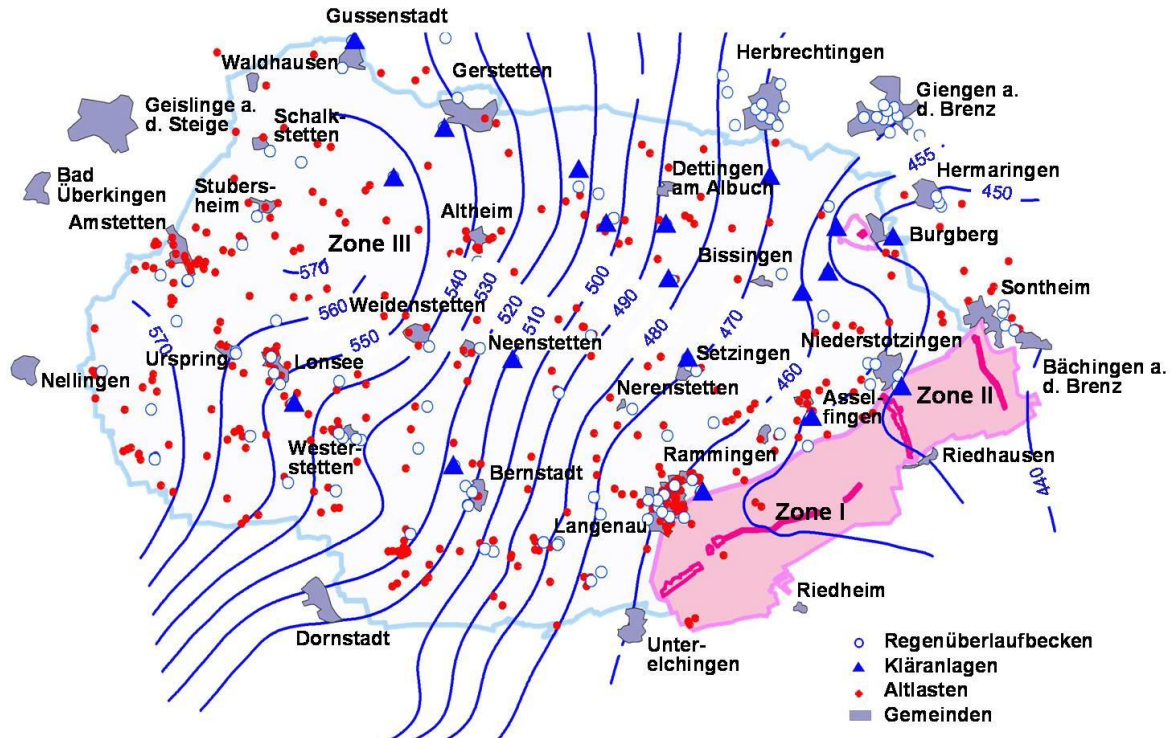


Bild 7: Gefährdungspotenziale für die Qualität des Grundwassers im Wasserschutzgebiet Donauried-Hürbe

Das Vorkommen von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen wurde in 74 Grundwasserbeobachtungsbrunnen im Wasserschutzgebiet untersucht. Die Ergebnisse sind in Bild 8 zusammenfassend dargestellt. 1H-Benzotriazol war in 34 % und die Tolyltriazole in 18 % der Proben mit einer Maximalkonzentration von 173 ng/L bzw. 75 ng/L nachweisbar. Die Konzentrationen im Rohwasser aus dem Donauried betragen maximal 37 ng/L für 1H-Benzotriazol bzw. 5 ng/L für die Tolyltriazole.

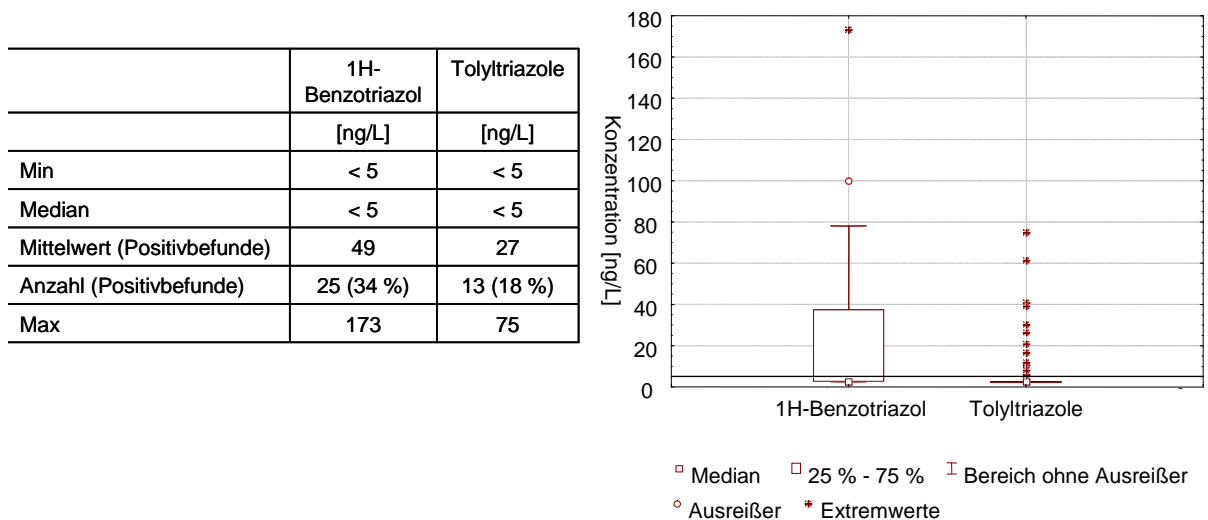


Bild 8: Konzentrationen von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen in Grundwasserproben aus dem Wasserschutzgebiet „Donauried-Hürbe“ (N = 74)

Die Ganglinien von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen in der Donau bei Leipheim sind in Bild 9 dargestellt. Die Konzentrationen lagen zwischen ca. 100 und 500 ng/L und damit erwartungsgemäß höher als im Grundwasser. Auch in den Zuflüssen der Donau im Raum Ulm, wie der Iller, Nau, Blau, Riß und Schmiech, waren 1H-Benzotriazol und die Tolyltriazole in vergleichbaren Konzentrationen nachweisbar.

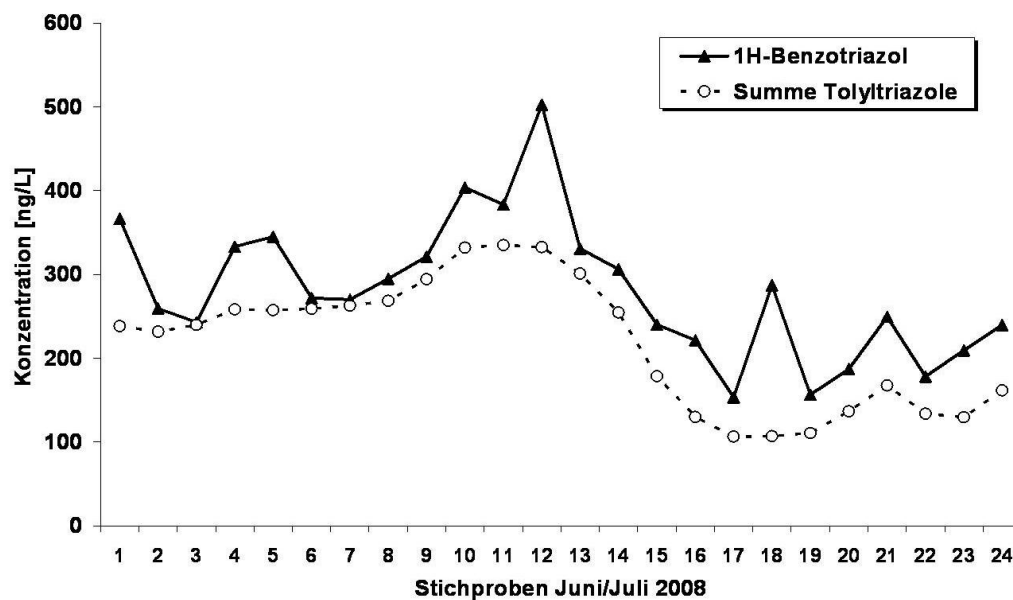


Bild 9: Ganglinie von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen in der Donau bei Leipheim

Die Konzentrationen der Substanzen im Ablauf kleiner kommunaler Kläranlagen (Asselfingen 2.500 Einwohnerwerte (EW) bis Langenau 16.600 EW) lagen zwischen 1.000 bis 5.000 ng/L für 1H-Benzotriazol und 2.000 bis 8.000 ng/L für Tolyltriazole. Bild 10 zeigt die Ganglinie für 1H-Benzotriazol und die Tolyltriazole im Ablauf der Kläranlage Langenau.

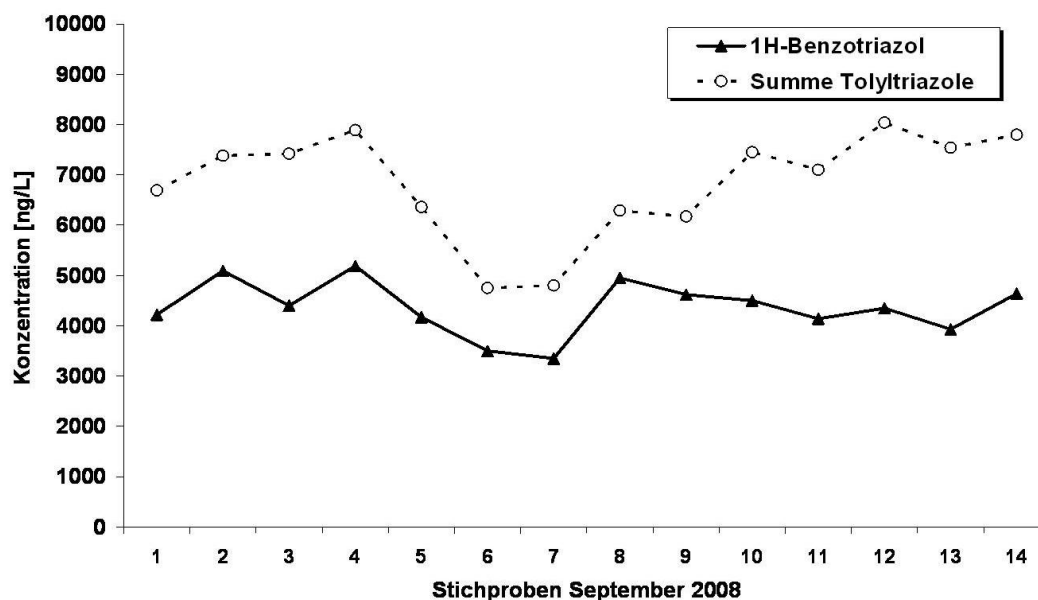


Bild 10: Ganglinie von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen im Ablauf der Kläranlage Langenau

Die stichprobenartig bestimmten Konzentrationen der Benzotriazole im Ablauf einer Großkläranlage mit über 400.000 EW ergaben für 1H-Benzotriazol Werte zwischen 3.500 und 4.800 ng/L und für die Tolyltriazole Werte zwischen 3.100 und 3.300 ng/L. Diese Ergebnisse sind mit den Konzentrationen der kleinen Anlagen im Wasserschutzgebiet vergleichbar.

Die Untersuchungen an einer stark industriell beeinflussten Großkläranlage ergaben 2.000 bis 4.000 ng/L für 1H-Benzotriazol, aber 12.000 bis 19.000 ng/L für die Tolyltriazole. Hinsichtlich der Tolyltriazol-Isomere konnte festgestellt werden, dass im gereinigten Abwasser 4-Methyl-1H-benzotriazol gegenüber 5-Methyl-1H-benzotriazol dominiert. Die Konzentrationen des 4-Methyl-Isomers waren bis zu ca. einer Dekade höher als die des 5-Methyl-Isomers (Bild 11). Dies ist vermutlich, wie von Weiß & Reemtsma [8] beschrieben, auf die unterschiedlich gute mikrobiologische Abbaubarkeit zurückzuführen.

Benzotriazole konnten ebenfalls in Stichproben in Autobahnabwasser (Ablauf Regenrückhaltebecken) bestimmt werden. Die Konzentrationen betragen 50 bis 200 ng/L für 1H-Benzotriazol bzw. 300 bis 800 ng/L für die Tolyltriazole.

Durch den Wechsel des Ionisationshilfsmittels bei der chromatographischen Methode ist es gelungen, die Tolyltriazol-Isomere besser zu trennen. Dies ist besonders dann wichtig, wenn sich die Konzentrationen der Isomere deutlich unterscheiden (Bild 11, unten rechts).

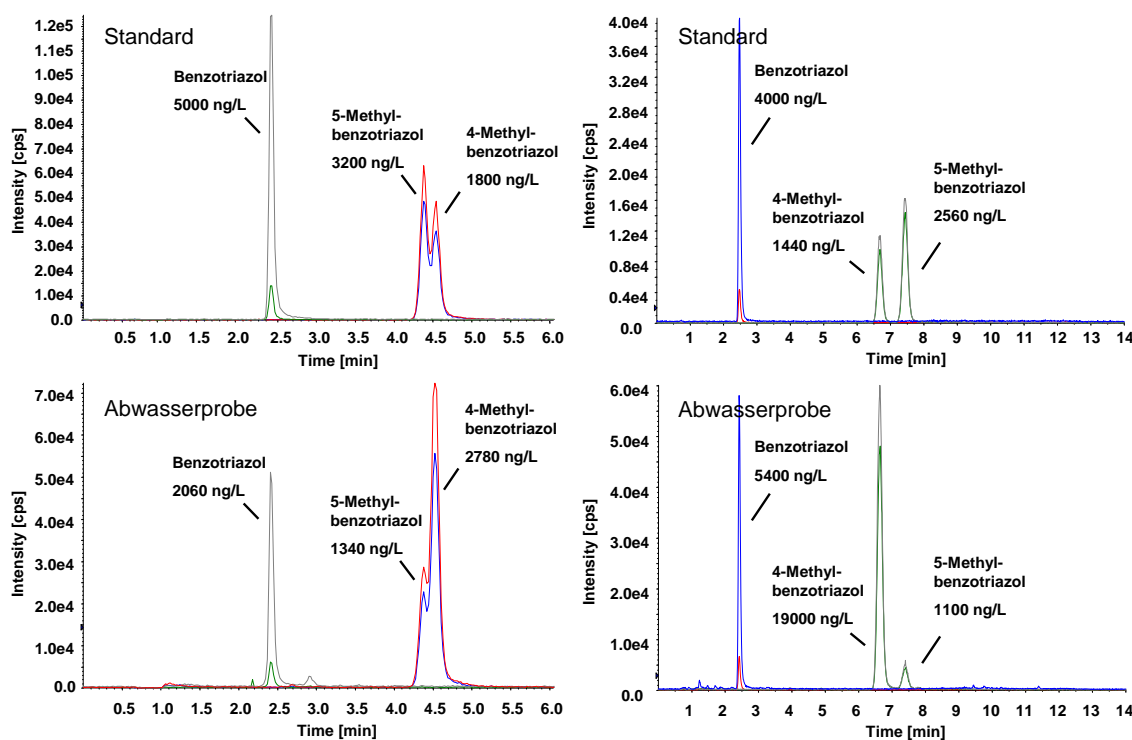


Bild 11: Vergleich der LC-MS/MS-Chromatogramme (zwei Massenübergänge) von 1H-Benzotriazol und Tolyltriazolen für jeweils einen Standard und eine Abwasserprobe mit der Standardmethode (links) und optimierten Trennmethode (rechts)

Im Vergleich der Konzentrationsverhältnisse von 1H-Benzotriazol mit den Tolyltriazolen in gereinigtem Abwasser, Oberflächenwasser und Grundwasser fällt auf, dass sich das Verhältnis zugunsten von 1H-Benzotriazol verschiebt (Bild 12). Dies konnte beispielhaft im Fall des Grundwassers aus dem westlichen Donauried gezeigt werden. Das gereinigte Abwasser der Kläranlage Langenau entwässert in den Fluss Nau, der durch das Donauried fließt.

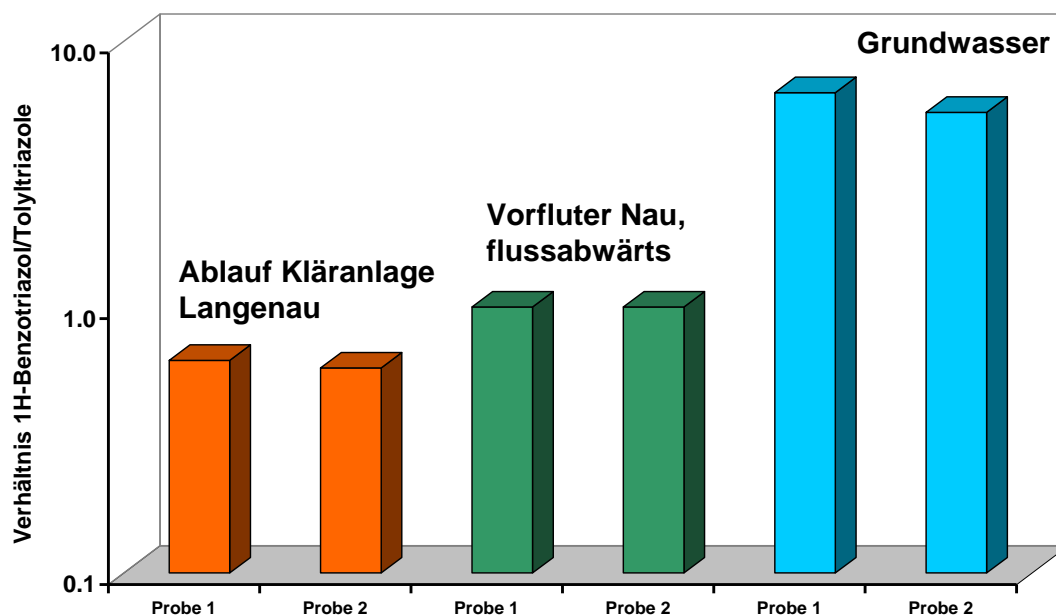


Bild 12: Verhältnis von 1H-Benzotriazol zu Tolyltriazolen im Ablauf einer Kläranlage, des entsprechenden Vorfluters und Grundwassers

4 Fazit und Ausblick

Das Vorkommen von Benzotriazolen nicht nur im Bereich von Flugplätzen oder Industrieanlagen, wie häufig in der Literatur beschrieben, sondern auch in kommunalen Abwässern kleinerer Gemeinden, macht deutlich, dass es sich bei diesen Substanzen um ubiquitär verbreitete Umweltchemikalien handelt, die auch auf den Einfluss von häuslichem Abwasser zurückzuführen sind. 1H-Benzotriazol und die Tolyltriazole waren nicht nur in nahezu allen untersuchten Oberflächengewässern, sondern ebenfalls im Grundwasser nachweisbar.

In Kläranlagenabläufen lagen die beobachteten Konzentrationen des 1H-Benzotriazols und der Tolyltriazole auf vergleichbarem Niveau, wobei die Tolyltriazole tendenziell mit leicht höheren Gehalten bestimmt werden konnten. Im Abstrom der Wasserfracht von den Kläranlagen über die Oberflächengewässer bis hin zum Grundwasser verschiebt sich das Verhältnis der Substanzen zugunsten von 1H-Benzotriazol.

Weiterhin wurden Verbindungen aus der Gruppe der Benzothiazole, die u.a. als Vulkanisationsbeschleuniger eingesetzt werden, in Abwässern detektiert. Die zusätzlich im Ablauf der Klär-

anlagen bestimmten Konzentrationen an 2-Amino-benzothiazol, 2-Hydroxy-benzothiazol, 2-(Methylthio)-benzothiazol und 2-Mercapto-benzothiazol lagen in der Summe im Bereich von ca. 200 bis 800 ng/L und waren somit deutlich geringer als die Gehalte der Benzotriazole.

Für einen Wasserversorger wie den Zweckverband Landeswasserversorgung ist es wichtig, mögliche Gefährdungspotenziale frühzeitig zu erkennen. Somit sind ergänzend zu den Informationen über das Vorkommen von Spurenstoffen in den Rohwässern auch Kenntnisse über deren Verhalten bei der Wasseraufbereitung von Bedeutung. Deshalb werden derzeit entsprechende Untersuchungen im Betriebs- und Forschungslaboratorium der Landeswasserversorgung durchgeführt.

Literatur

- [1] Weber, W. H., Seitz, W., Schulz, W., Wagener, H.-A.: Nachweis der Metaboliten Desphenylchloridazon und Methyl-desphenyl-chloridazon in Oberflächen-, Grund- und Trinkwasser, *Vom Wasser*, 2007, 105 (1), 7.
- [2] Morlock, G. E.: Analysis of pesticide residues in drinking water by planar chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1996, 754, 423.
- [3] Schulz, W., Seitz, W., Weiß, S. C., Weber, W. H., Böhm, M., Flottmann, D.: Use of *Vibrio fischeri* for screening for bioactivity in water analysis, *J. Planar Chromatogr.*, 2008, 21 (6), 427.
- [4] La Farré, M., Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D.: Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, 991.
- [5] Cancilla, D. A., Martinez, J., van Aggelen, G. C.: Detection of aircraft deicing/antiicing fluid additives in a perched water monitoring well at an international airport, *Environ. Sci. Technol.*, 1998, 32, 3834.
- [6] Weiß, S., Jakobs, J., Reemtsma, T.: Discharge of three benzotriazole corrosion inhibitors with municipal wastewater and improvements by membrane bioreactor treatment and ozonation, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 7193.
- [7] Voutsas, D., Hartmann, P., Schaffner, C., Giger, W.: Benzotriazoles, alkylphenols and bisphenol A in municipal wastewaters and in the Glatt River, Switzerland, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 2006, 13, 333.

-
- [8] Giger, W., Schaffner, C., Kohler, H.-P. E: Benzotriazole and Tolyltriazole as aquatic contaminants. 1. Input and Occurrence in rivers and lakes, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 7186.
- [9] Loos, R., Gawlik, B. M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G.: EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environ. Pollut.*, 2009, 157, 561.
- [10] Weiß, S.: Potential von Membranbioreaktoren zur Entfernung von polaren persistenten Spurenstoffen aus Kommunalabwasser, Dissertation, Technische Universität Berlin, 2007.
- [11] Weiß, S., Reemtsma, T.: Membrane bioreactors for municipal wastewater treatment - A viable option to reduce the amount of polar pollutants discharged into surface water?, *Wat. Res.*, 2008, 42, 3837.
- [12] Pillard, D. A., Cornell, J. S., DuFresne, D. L., Hernandez, M. T.: Toxicity of benzotriazole and benzotriazole derivatives to three aquatic species, *Wat. Res.*, 2001, 35, 557.
- [13] Weiß, S., Reemtsma, T.: Determination of benzotriazole corrosion inhibitors from aqueous environmental samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 7415.

11.3 Supplementary Information

11.3.1 Publikation I

Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A New Approach to Data Evaluation in the Non-Target Screening of Organic Trace Substances in Water Analysis, *Chemosphere* 85, 1211-1219, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.009, Copyright Elsevier.

Reproduced with permission.

Table S1: Settings of the ESI source and the QTOF-MS

Instrument parameter	Setting	
Drying gas (flow rate)	Nitrogen (10 L min ⁻¹)	
Drying temperature	350°C	
Capillary voltage	ESI + + 3650 V	ESI – – 3650 V
Fragmentor voltage	185 V	
Skimmer voltage	65 V	
Mode	MS-only and MS/MS	
Scan range	30 - 1050 m/z	
Scan rate	MS: MS/MS:	1 spectrum s ⁻¹ 2 spectra s ⁻¹
Continuous lock mass correction	active	
Reference masses m/z (resolution power)	ESI + 121.0508 (> 10000) 922.0097 (> 17000)	ESI – 119.0363 (> 10000) 980.0164 (> 20000)

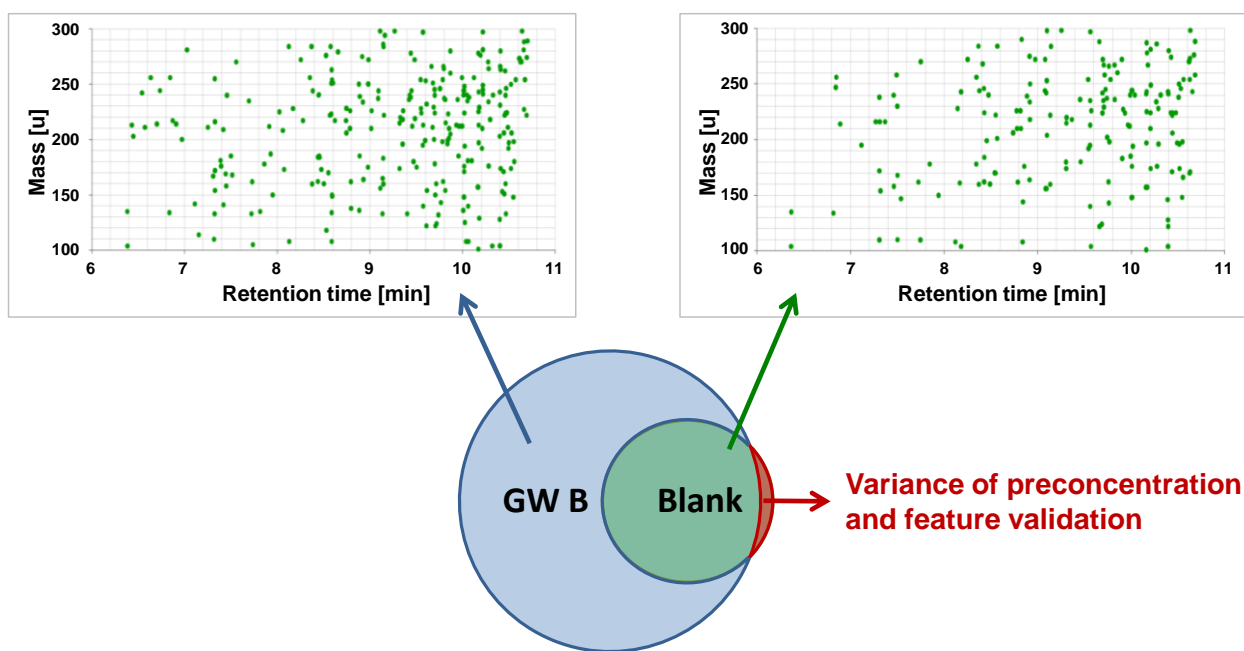


Figure S1: Correction of the GW well B sample for features in the blank

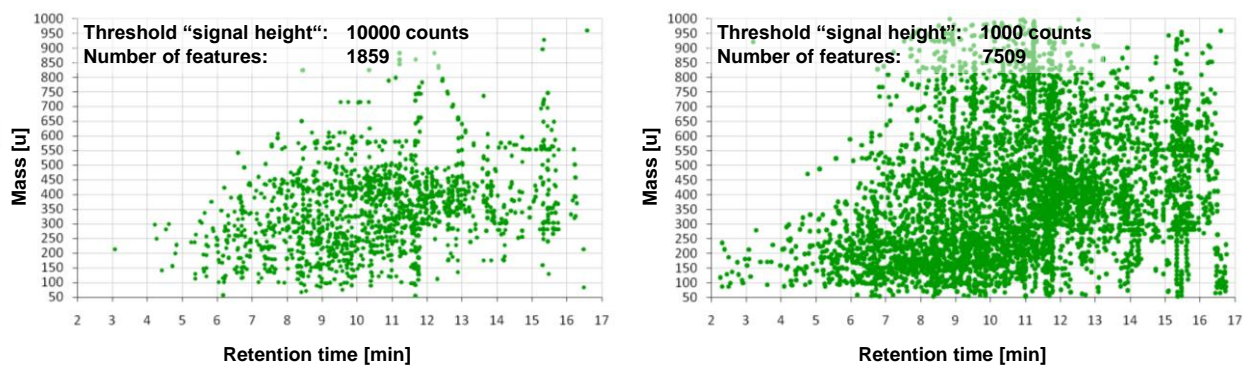


Figure S2: Dependence of the number of extracted features on the threshold "signal height"
Mass vs. retention time scatter plots of a landfill leachate sample (SPE at pH =3)

» HOME » SEARCH » INDEX » NEW SUBSTANCE » ADMIN

A A A 

» LOGOUT » EDIT USER

SEARCH

Search Parameter

Exact Mass	<input type="text"/>	Tolerance	ppm	10	0.5
Precursor Mass	<input type="text"/>	Tolerance	ppm	10	0.5
Fragment Masses	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>	Tolerance	ppm	10	0.5
Mass range	<input type="text"/> <input type="text"/>		ppm		
Substance Name	<input type="text"/>		unit		

» SHOW/HIDE ADDITIONAL OPTIONS

Formula

CAS Number

Main Class Not available

Sub Class Not available

Figure S3: Search options (DAIOS-Online)

» HOME » SEARCH » INDEX » NEW SUBSTANCE » ADMIN

A A A 

» LOGOUT » EDIT USER

ISOPROTURON

MAIN | SECONDARY DATA | MISC | **MS/MS** | CHROMATOGRAPHY | TRANSFORMATION TREE

Precursor Mass


H+ -H+
 NH4+ Cl
 Na+ Br
 K+ HCOO
 Other

Fragment Mass

207.14919 [M+H]⁺ 165.102 134.096 91.054 72.045

Figure S4: MS/MS table of isoproturon (DAIOS-Online)

» HOME » SEARCH » INDEX » NEW SUBSTANCE » ADMIN

AAÄ 

» LOGOUT » EDIT USER

4-ISOPROPYLANILINE

MAIN | SECONDARY DATA | Misc | Ms/Ms | CHROMATOGRAPHY | TRANSFORMATION TREE

Warning: changes take effect immediately, a save is performed automatically

Precursor to 4-Isopropylaniline ADD NEW	N-(4-isopropylphenyl)-urea 178.110613 C10H14N2O remove	N-(4-isopropylphenyl)-N'-methylurea 192.126263 C11H16N2O remove	Isoproturon 206.141913 C12H18N2O remove
(4-(1-Hydroxy-1-methyl-2,4-Benzenetriol 1,2-Dihydro-4-amino-1,2-Dihydroxynaphtha 1,4-Dihydroxynaphtha 1,6-Dihydroxynaphtha 1,7-Dihydroxynaphtha 1-Acetyl-1-methyl-2-di	4-Isopropylaniline 135.104799 C9H13N		
ADD NEW Decompositions of 4-Isopropylaniline	(4-(1-Hydroxy-1-methylethyl)aniline 151.099714 C9H13NO remove	4,4-Diisopropyl-azobenzene 266.178299 C18H22N2 remove	4,5-bis-(4-isopropylphenylamino)-3,5-cyclohexadiene-1,2-dione 344.225249 C24H28N2 remove

Figure S5: Transformation Tree of 4-isopropylaniline (DAIOS-Online)

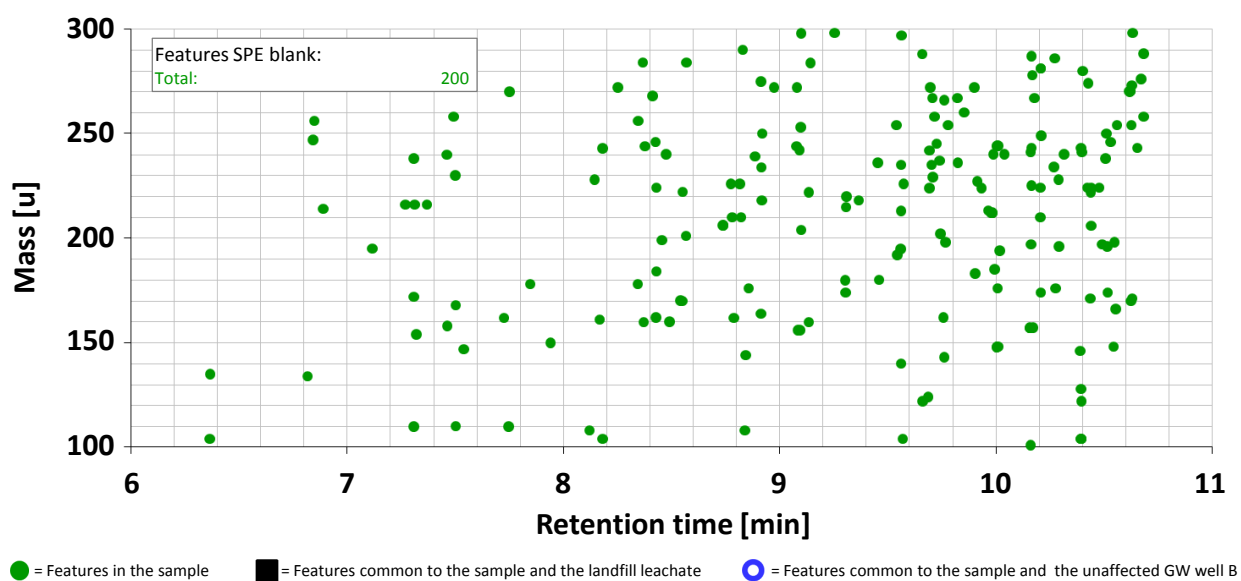


Figure S6: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the SPE blank sample

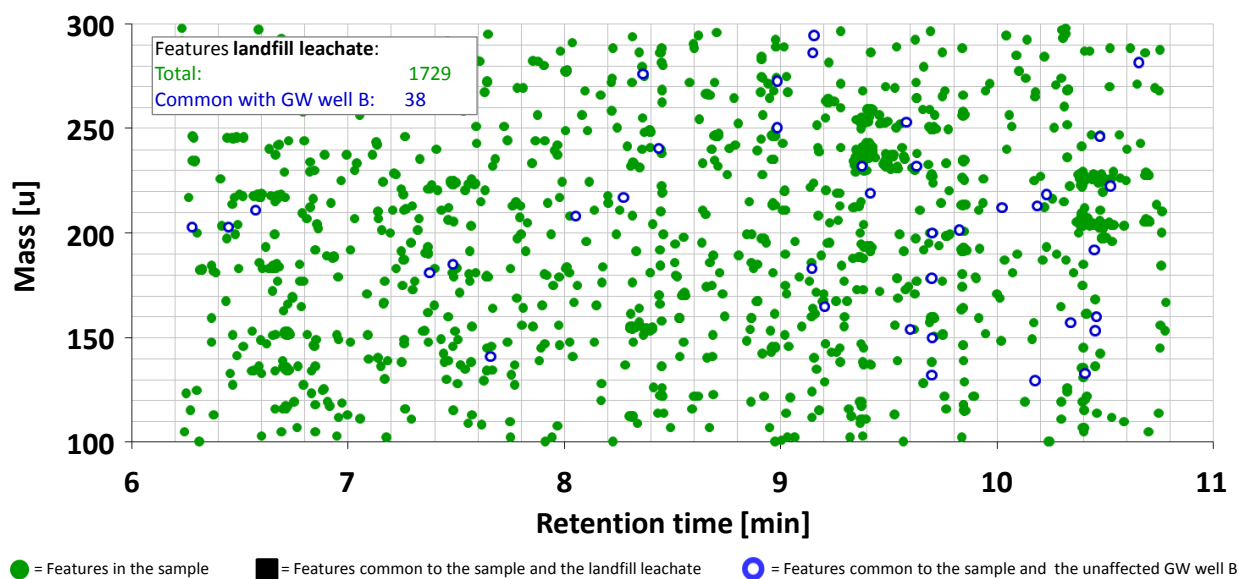


Figure S7: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the landfill leachate sample (blank corrected)

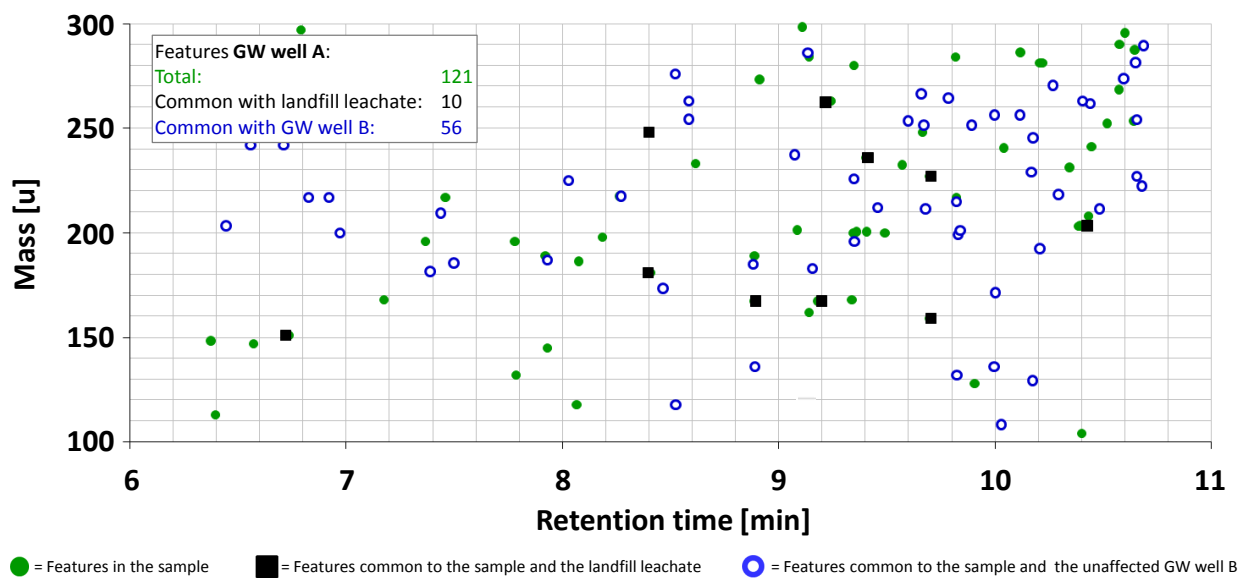


Figure S8: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the GW well A sample (blank corrected)

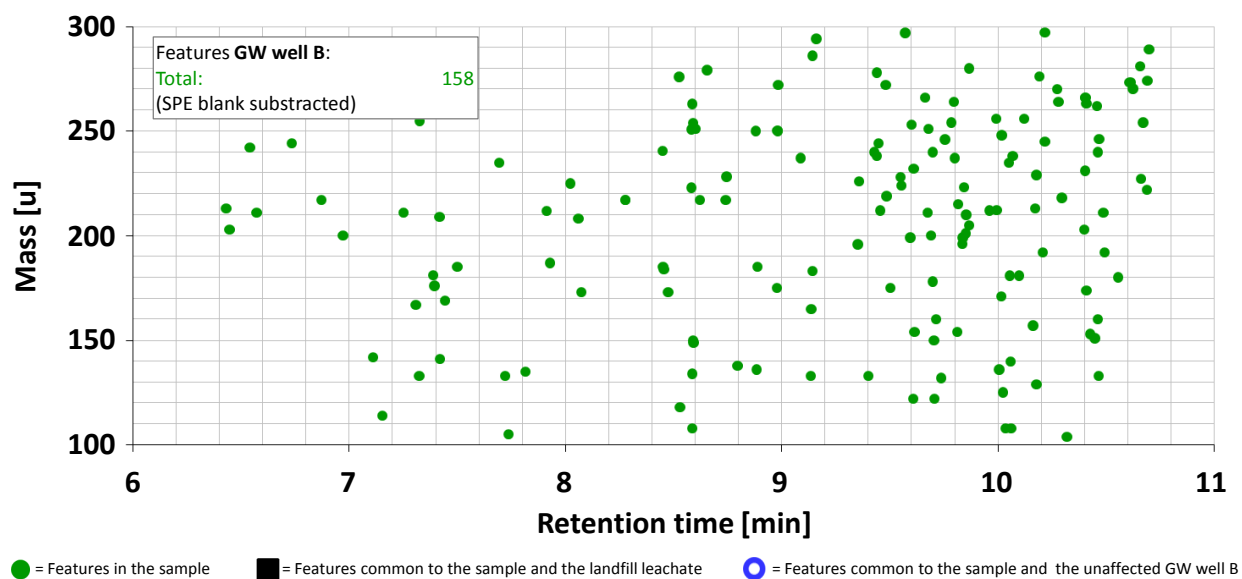


Figure S9: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the GW well B sample (blank corrected)

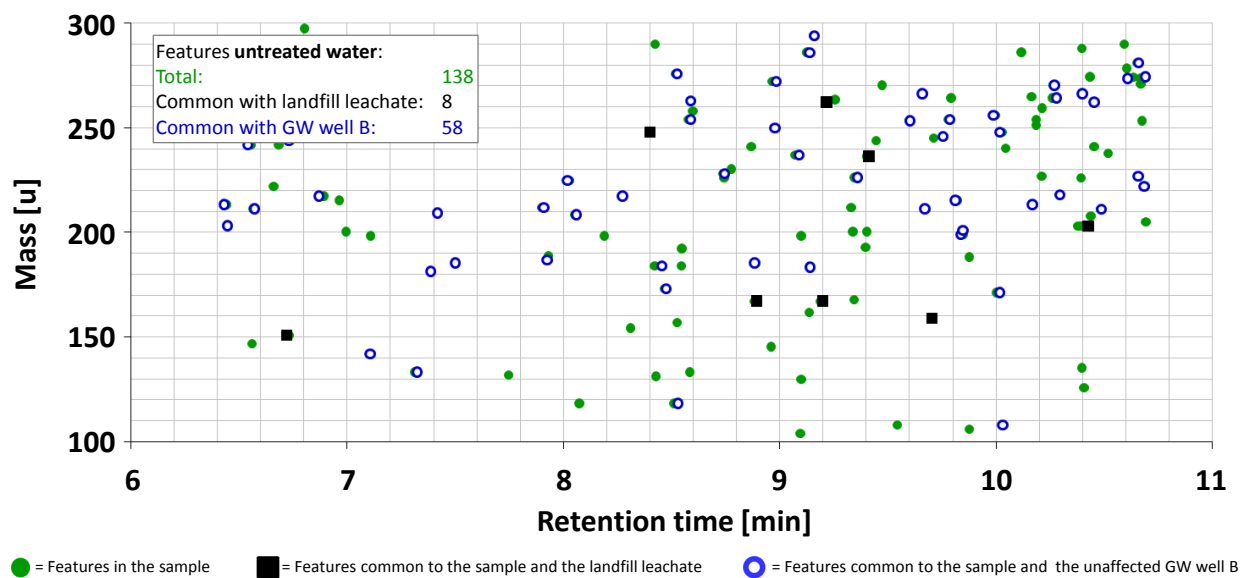


Figure S10: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the untreated water sample (blank corrected)

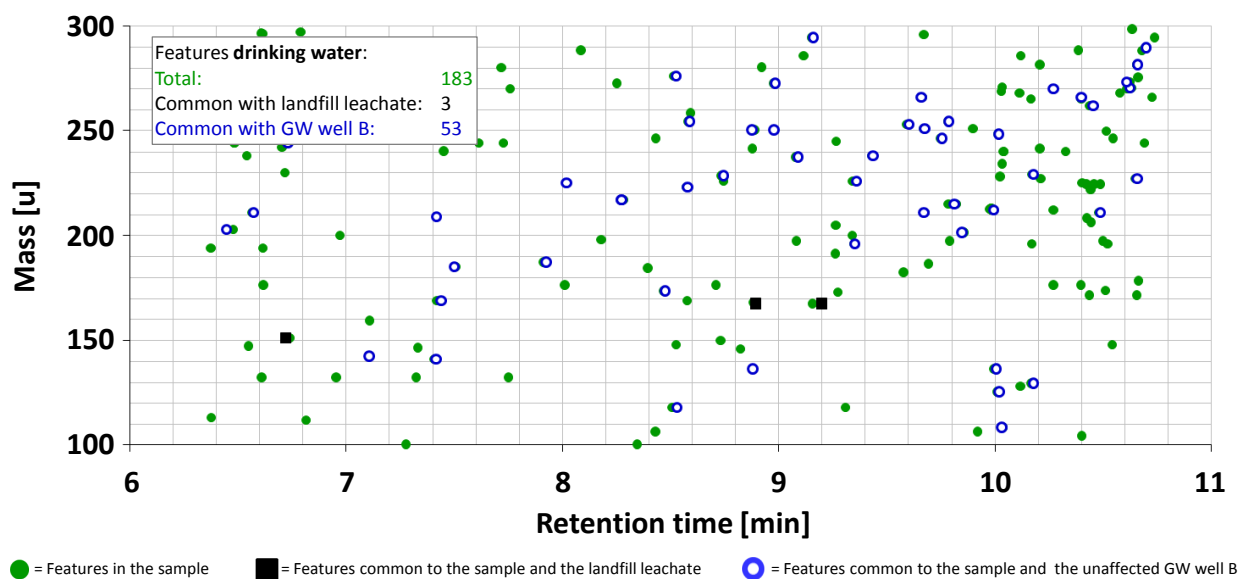


Figure S11: Mass vs. retention time scatter plot of the features in the drinking water sample (blank corrected)

Structure elucidation

Databases used:

Online databases

- ChemSpider: <http://www.chemspider.com/SimpleSearch.aspx>
- DAIOS-Online: <http://www.DAIOS-Online.com>
- MassBanks: <http://www.massbank.jp/QuickSearch.html>
- Metlin: http://metlin.scripps.edu/metabo_search_alt2.php
- PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>

Local databases

- METLIN Personal Metabolite Database Software (>15000 database entries of pharmaceuticals)
- Custom-made database (> 800 database entries important chemicals for the aquatic environment)

1-Adamantylamine

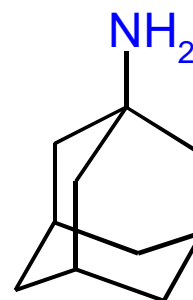
CAS-Number: 768-94-5

Chemical formula: C₁₀H₁₇N

Exact mass: 151.1361 u

Precursor: m/z [M+H]⁺: 152.1434

Retention time: 6.7 min



MS/MS spectra

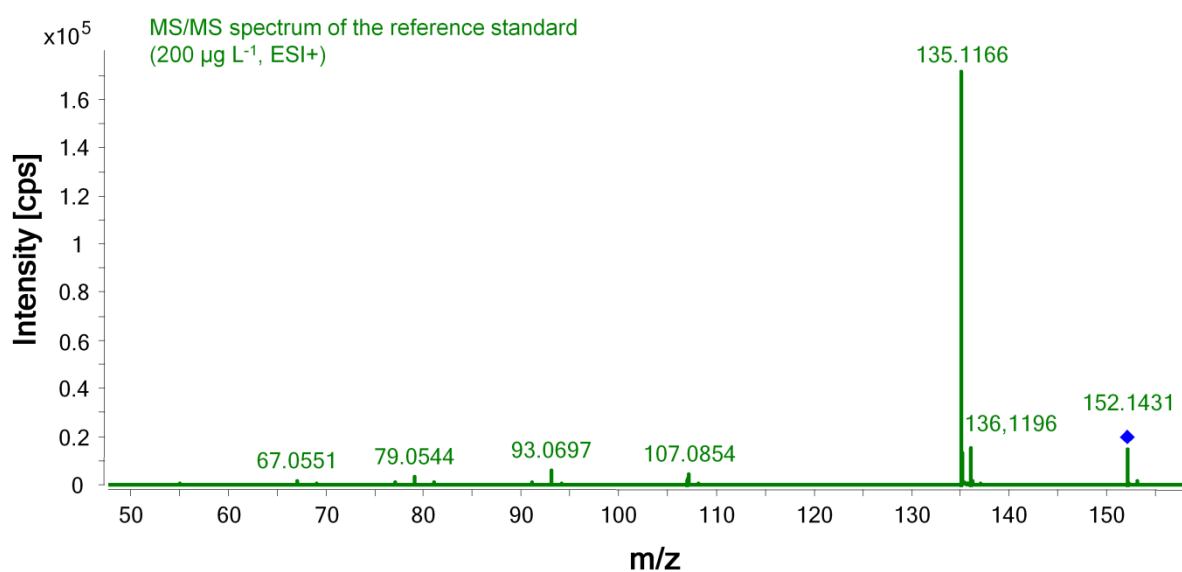
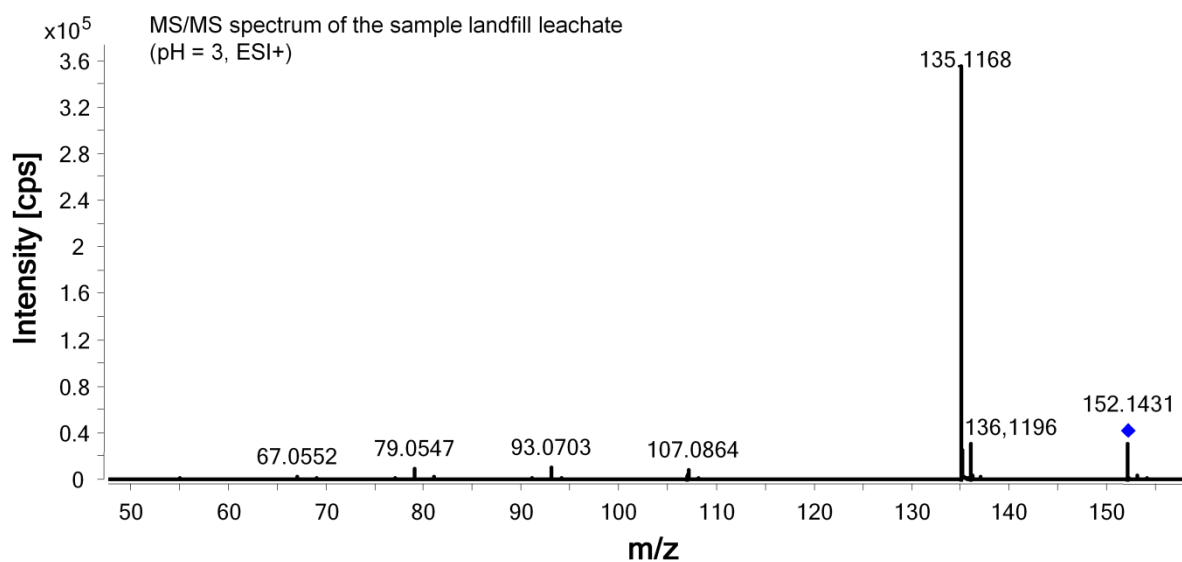


Figure S12: MS/MS spectra of 1-adamantylamine

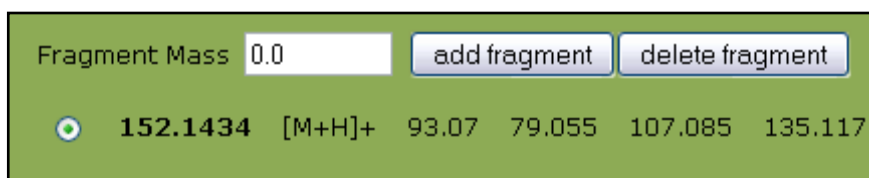


Figure S13: Plausibility test with MS/MS data from the online databases DAIOS-Online

H/D exchange

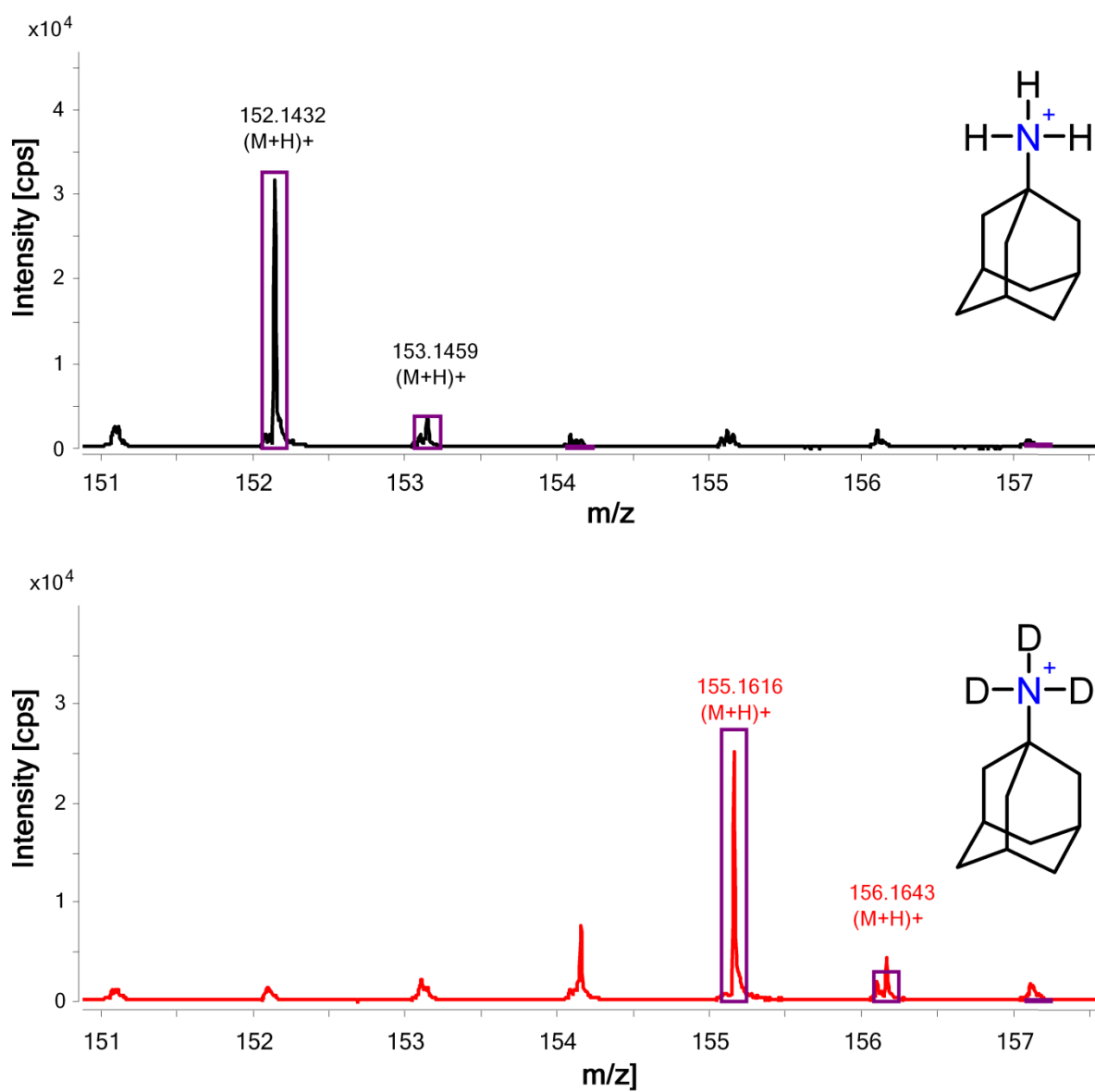
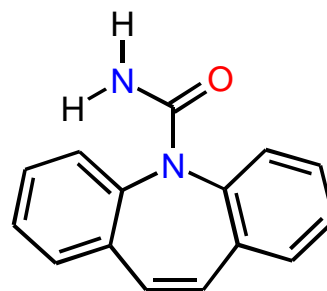
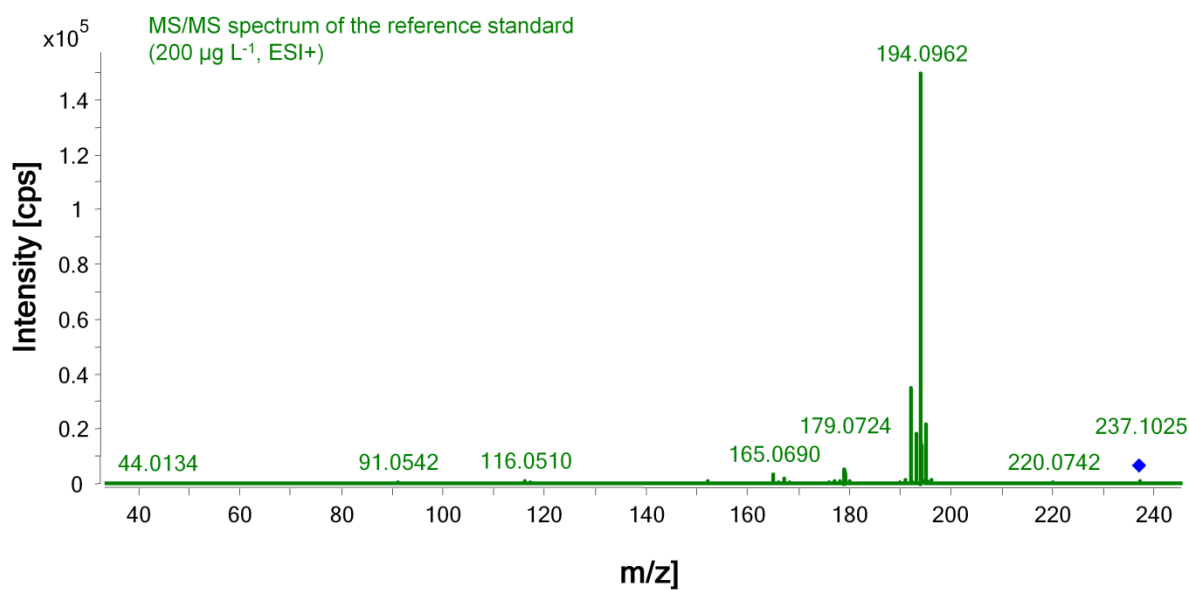
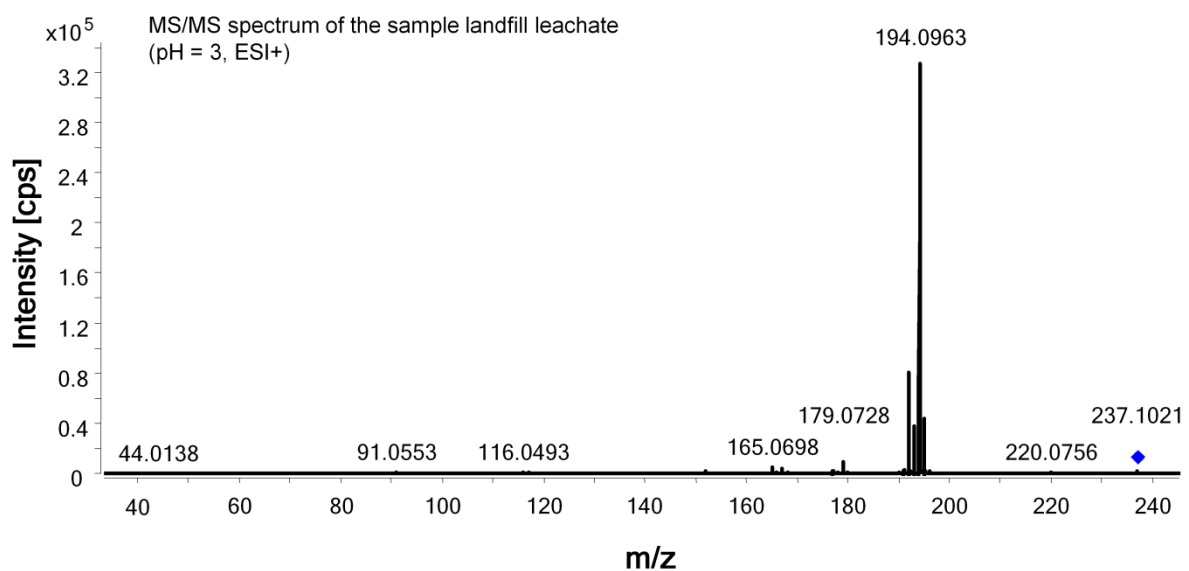


Figure S14: Triple H/D exchange of 1-adamantylamine

Carbamazepine

CAS-Number: 298-46-4
Chemical formula: C₁₅H₁₂N₂O
Exact mass: 236.0950 u
Precursor: m/z [M+H]⁺: 237.1022
Retention time: 9.4 min

**MS/MS spectra****Figure S15: MS/MS spectra of carbamazepine**

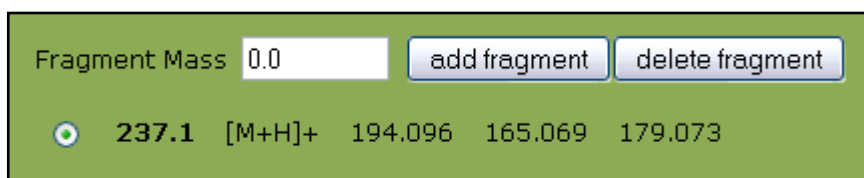


Figure S16: Plausibility test with MS/MS data from the DAIOS-Online database

H/D exchange

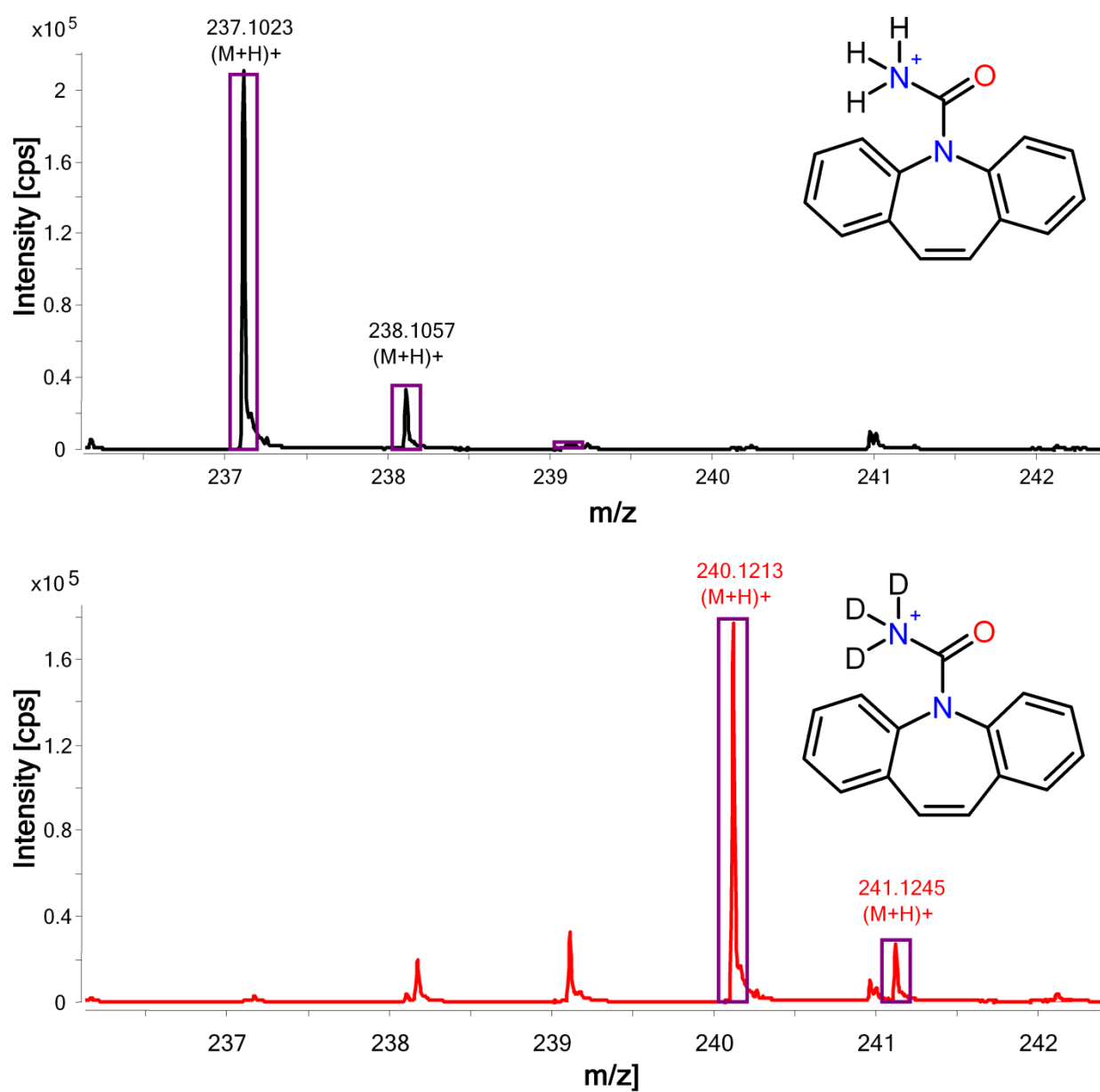
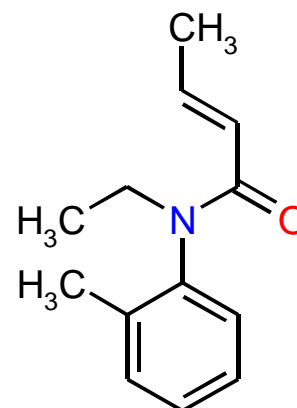
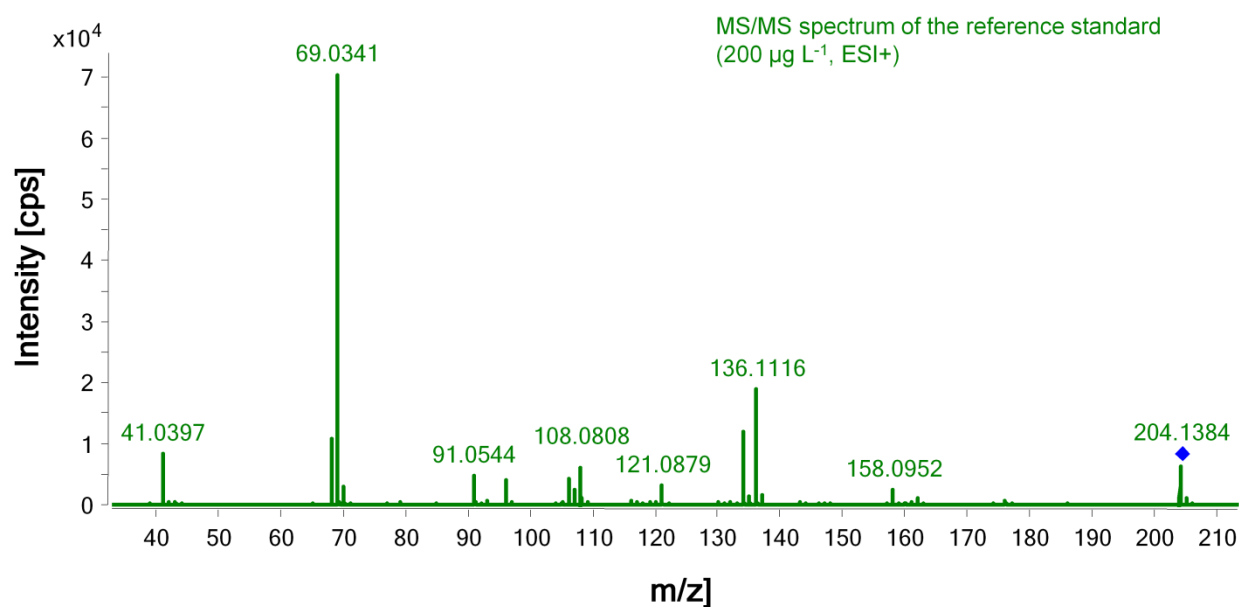
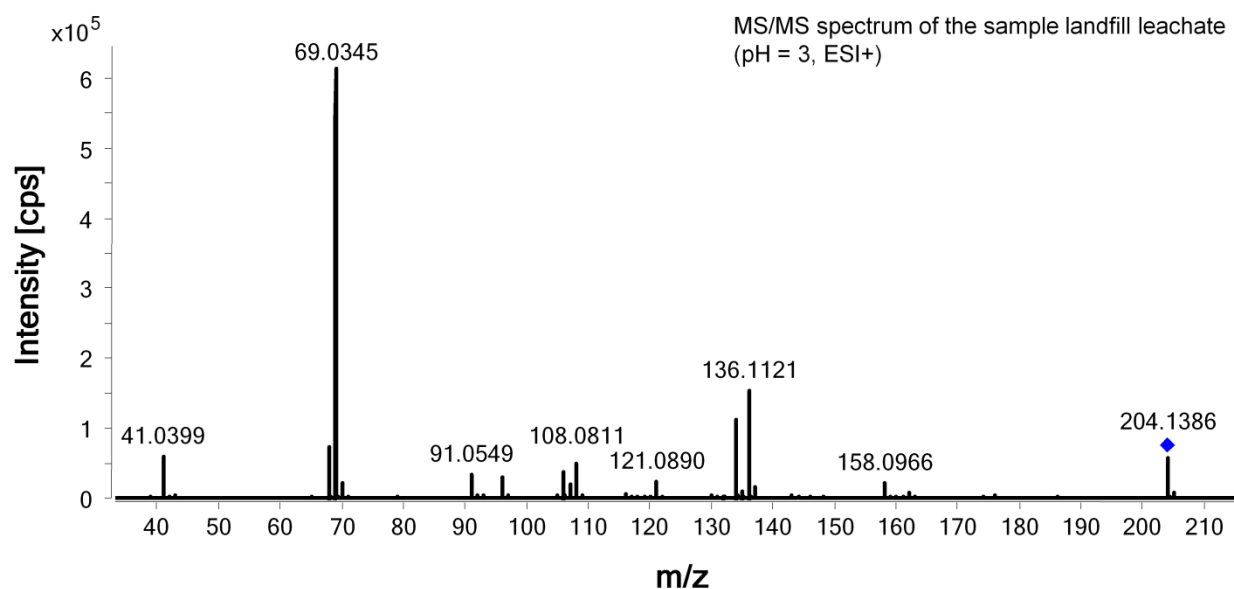


Figure S17: Triple H/D exchange of carbamazepine

Crotamiton

CAS-Number: 483-63-6
Chemical formula: C₁₃H₁₇N₀
Exact mass: 203.1310 u
Precursor: m/z [M+H]⁺: 204.1383
Retention time: 10.4 min

**MS/MS spectra****Figure S18: MS/MS spectra of crotamiton**

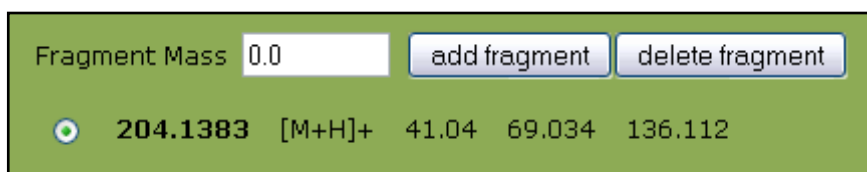


Figure S19: Plausibility test with MS/MS data from the DAIOS-Online database

H/D exchange

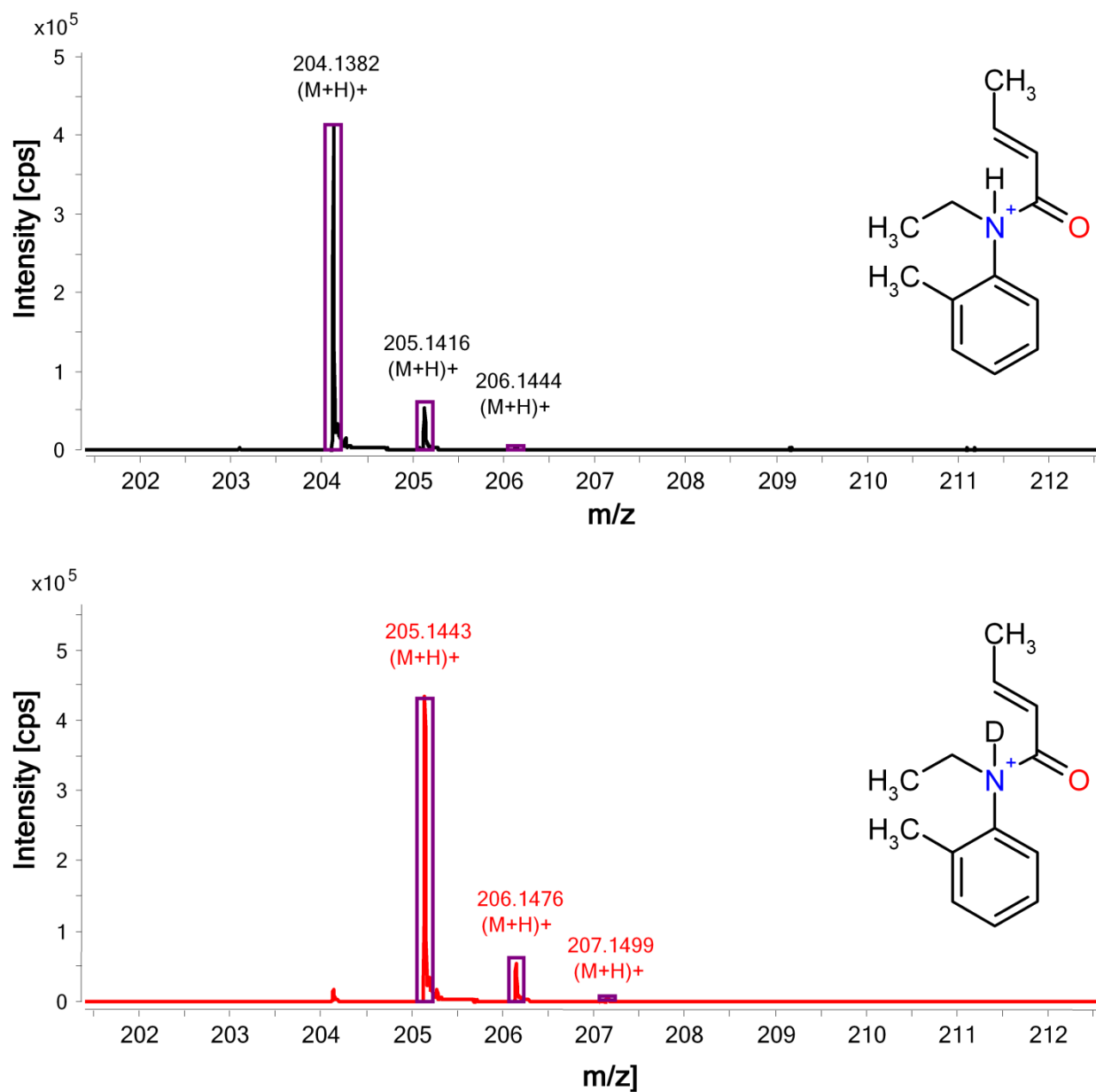


Figure S20: Single H/D exchange of crotamiton

N,N-Diethyl-m-toluamide (DEET)

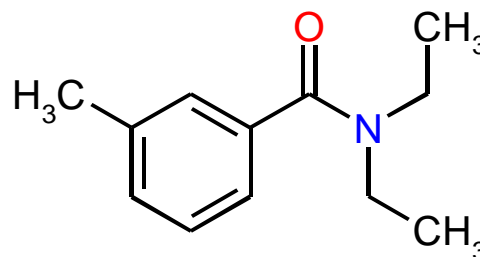
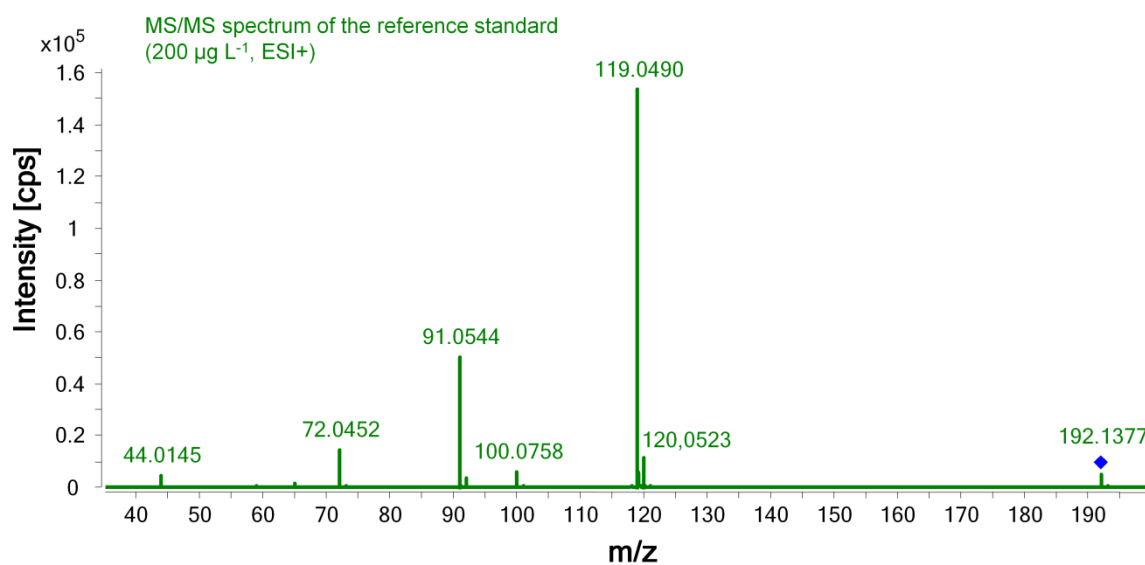
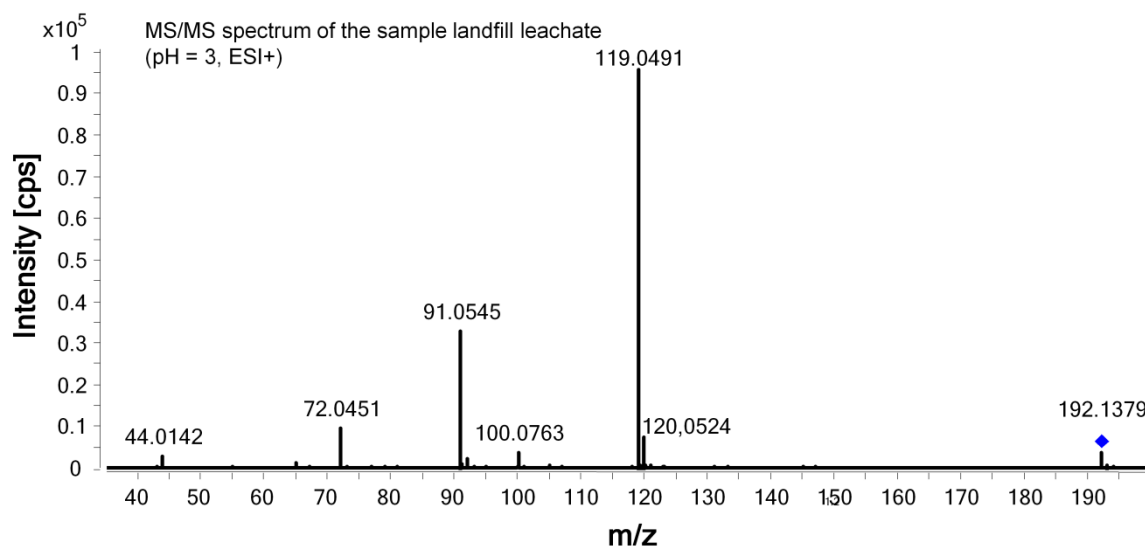
CAS-Number: 134-62-3

Chemical formula: C₁₂H₁₇N₁O

Exact mass: 191.1310 u

Precursor: m/z [M+H]⁺: 192.1383

Retention time: 9.8 min

**MS/MS spectra****Figure S1: MS/MS spectra of DEET**

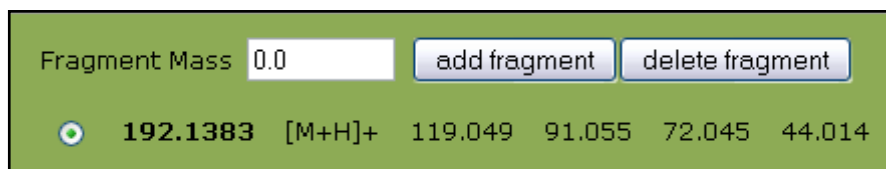


Figure S2: Plausibility test with MS/MS data from the DAIOS-Online database

H/D exchange

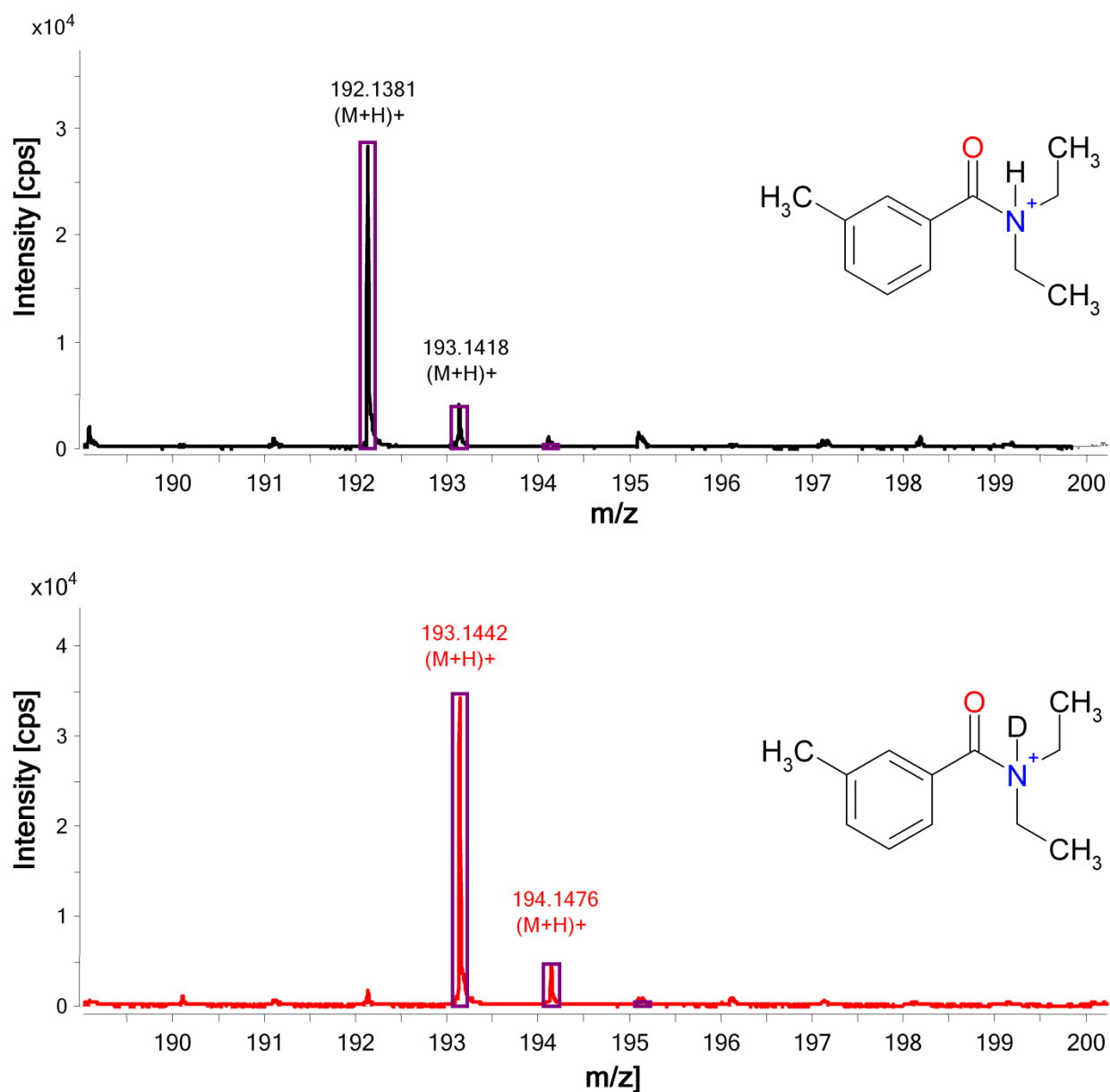


Figure S3: Single H/D exchange of DEET

11.3.2 Publikation II

Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, A., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2010): Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(5), 659 - 666, DOI:10.1002/rcm.4430.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Additional information about the location of the monitoring well

The Donauried in Baden-Wuerttemberg is one of the most important ground water reservoirs in the country. It contains about one billion cubic metres of water. The ground water gained from Donauried and Burgberg is fed by the yielding source from the Swabian Albs, a 150 million year old lime stone formation. For this reason, the karst ground water contains a large amount of calcium and magnesium. The water hardness has an average of 22° dH (German hardness degree), the peak value is 28° dH.

Rainfall quickly drains away on the tableland of the Alb. Just under 3,000 litres per second, respectively 87 million cubic metres annually flow into the widely ranged subterranean fissures and disruptions of the White Jurassic towards the South East Donauried. The water needs about 12 years for its journey. The Swabian Donauried, between Langenau and Sontheim, belongs to the few regions in Baden-Württemberg which are abundant with water. This is where rich, natural groundwater streams meet flowing subterraneously alongside the Donauried and coming from the Swabian Alb.

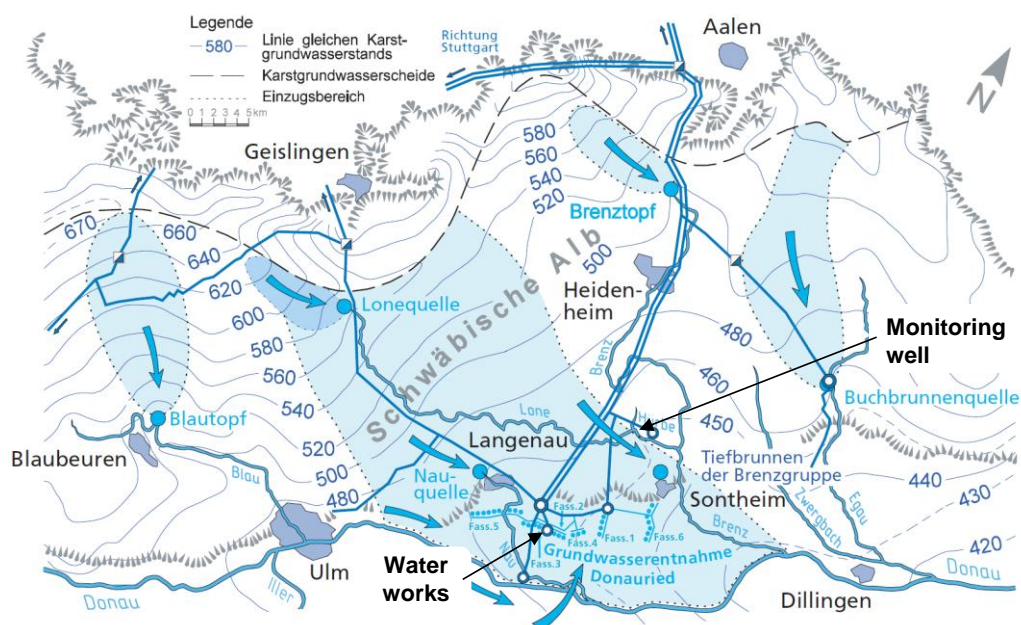


Figure 1: Groundwater inflow and water catchment of Donauried

Additional information of HPTLC

Table 1: Settings of the 1st HPTLC gradient

Gradient				
Step	Methanol : Formic acid 100 : 0.5 [%]	Dichloromethane [%]	Migration distance [mm]	Drying time [min]
1	100.0	0.0	15	2
2	100.0	0.0	15	2
3	100.0	0.0	15	2
4	30.0	70.0	17	2
5	30.0	70.0	19	2
6	30.0	70.0	22	2
7	30.0	70.0	24	2
8	30.0	70.0	26	2
9	28.0	72.0	29	2
10	26.0	74.0	31	2
11	24.0	76.0	33	2
12	22.0	78.0	36	2
13	20.0	80.0	38	2
14	18.0	82.0	40	2
15	16.0	84.0	43	2
16	14.0	86.0	45	2
17	12.0	88.0	47	2
18	10.0	90.0	50	2
19	8.0	92.0	52	2
20	6.0	94.0	54	2
21	4.0	96.0	57	2
22	2.0	98.0	59	2
23	0.0	100.0	61	2

Table 2: Settings of the optimised HPTLC gradient

Gradient					
Step	Methanol : Formic acid 100 : 0.5 [%]	ACN : Formic acid 100 : 0.5 [%]	Dichloromethane [%]	Migration distance [mm]	Drying time [min]
1	100.0	0.0	0.0	12	3
2	100.0	0.0	0.0	12	3
3	100.0	0.0	0.0	12	3
4	100.0	0.0	0.0	12	3
5	0	70.0	30.0	15	3
6	0	66.0	34.0	18	3
7	0	63.0	37.0	21	3
8	0	60.0	40.0	24	3
9	0	56.0	44.0	27	2
10	0	54.5	45.5	30	2
11	0	52.9	47.1	33	2
12	0	51.4	48.6	36	2
13	0	49.9	50.1	39	2
14	0	48.4	51.6	42	2
15	0	46.8	53.2	45	2
16	0	45.3	54.7	48	2
17	0	43.8	56.2	51	2
18	0	42.2	57.8	54	2
19	0	40.7	59.3	57	2
20	0	39.6	60.8	60	2
21	0	37.6	62.4	63	2
22	0	36.1	63.9	66	2
23	0	34.6	65.4	69	2
24	0	33.1	66.9	72	2
25	0	31.5	68.5	75	2
26	0	30.0	70.0	78	2
27	0	28.5	71.5	81	10
28	0	0.0	100.0	84	15

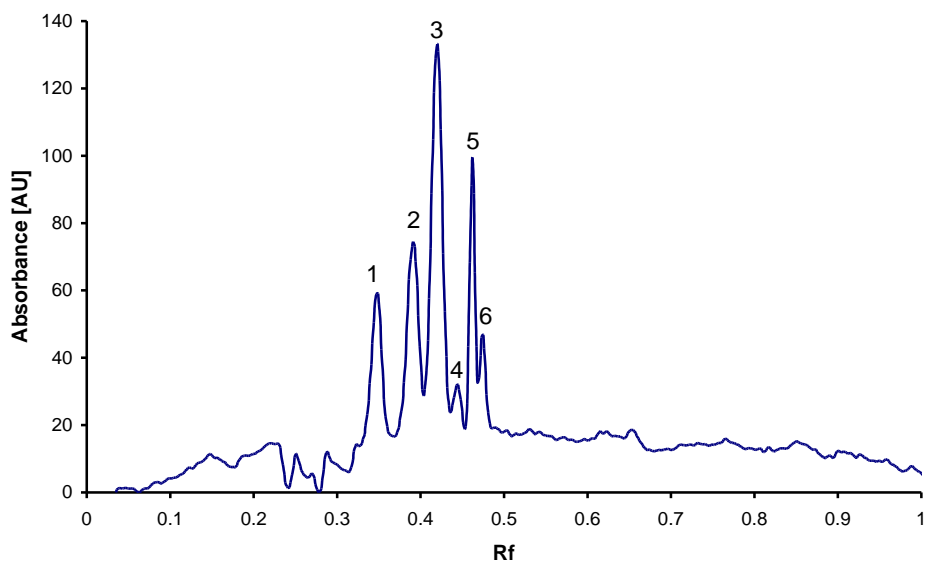


Figure 2: Absorbance scan ($\lambda = 500 \text{ nm}$) from the developed HPTLC-Plate (1st gradient)

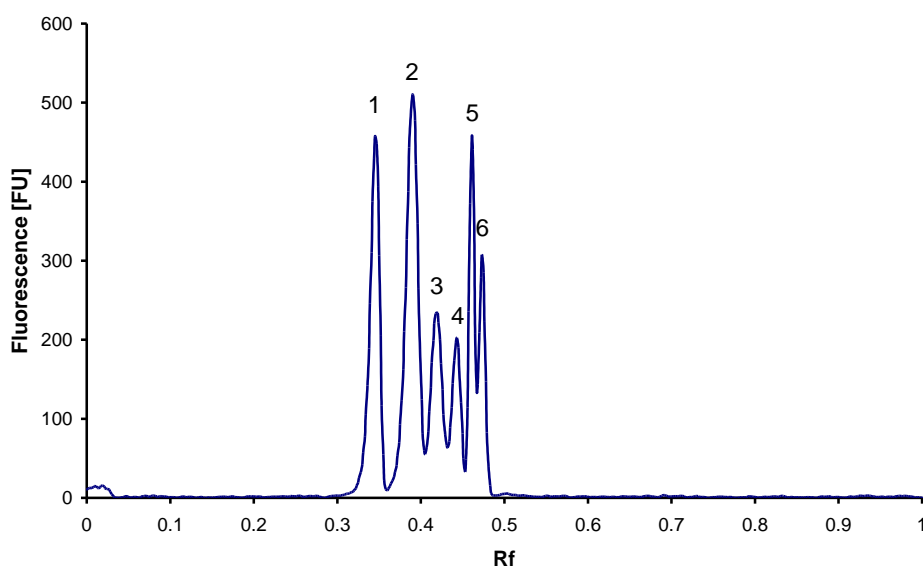


Figure 3: Fluorescence scan ($\lambda_{exc.} = 300 \text{ nm}$) from the developed HPTLC-Plate (1st gradient)

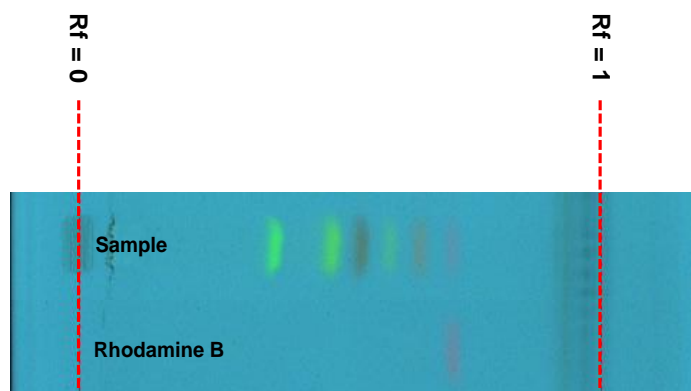


Figure 4: Fluorescence quenching ($\lambda = 254 \text{ nm}$)

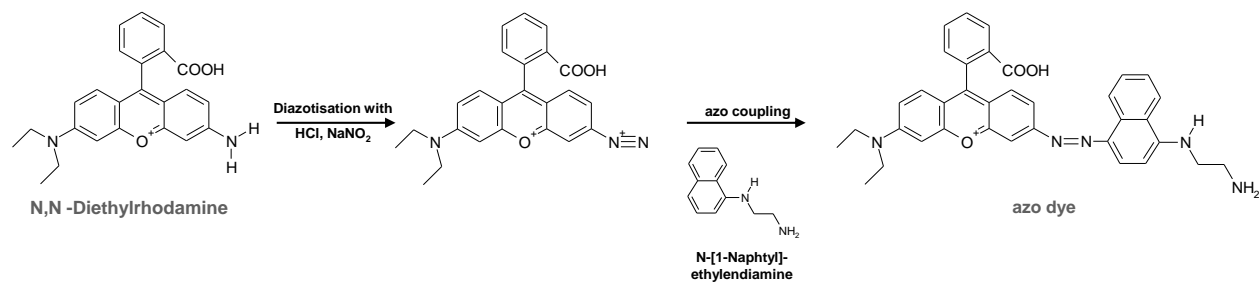


Figure 5: Reaction scheme of the colouration experiment by using the Bratton-Marshall reagent

Additional information of Nano-chip HPLC-QTOF

MS/MS spectra of rhodamine B and its de-ethylated transformation products

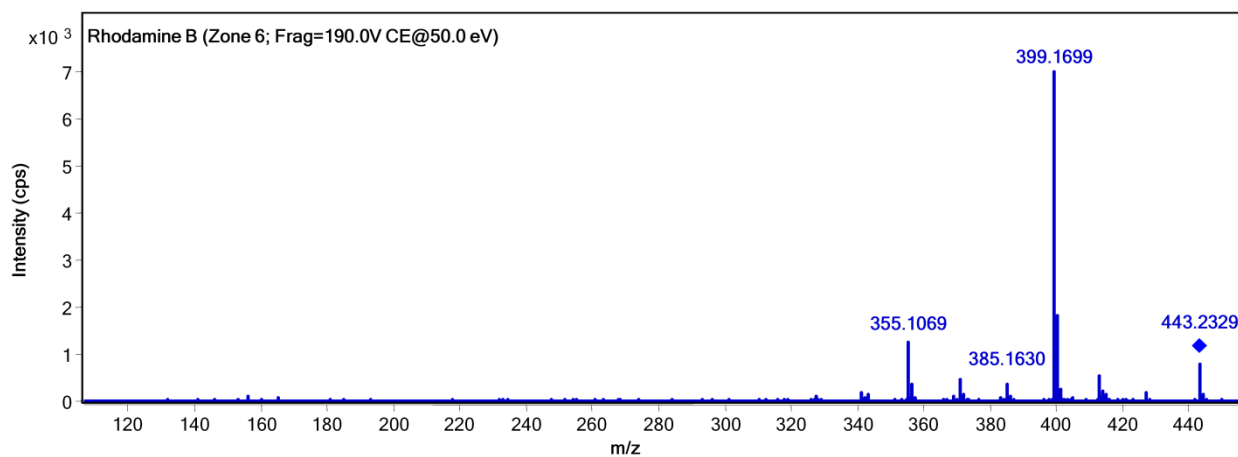


Figure 6: MS/MS spectrum of rhodamine B (HPTLC zone 6)

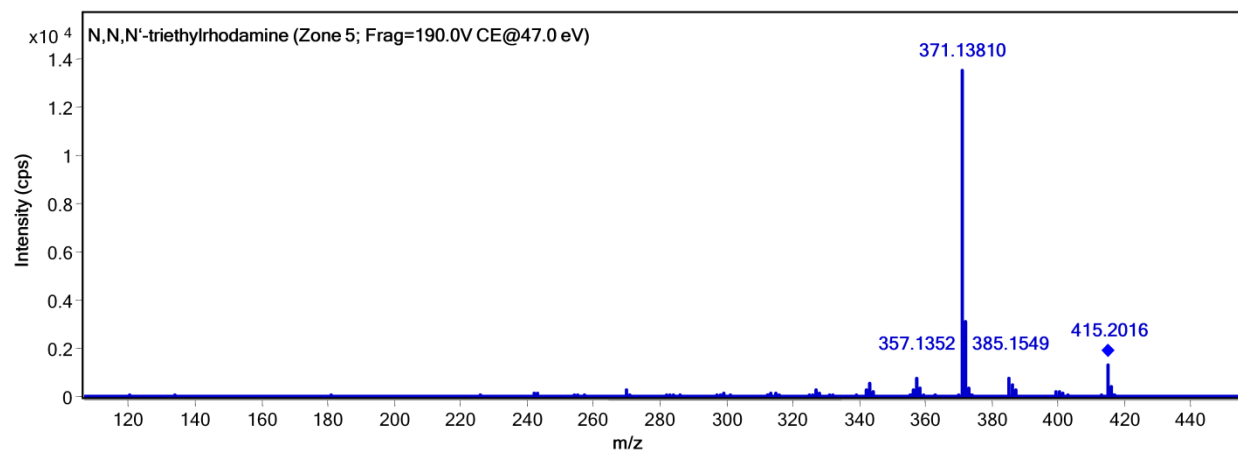


Figure 7: MS/MS spectrum of N,N,N'-triethylrhodamine (HPTLC zone 5)

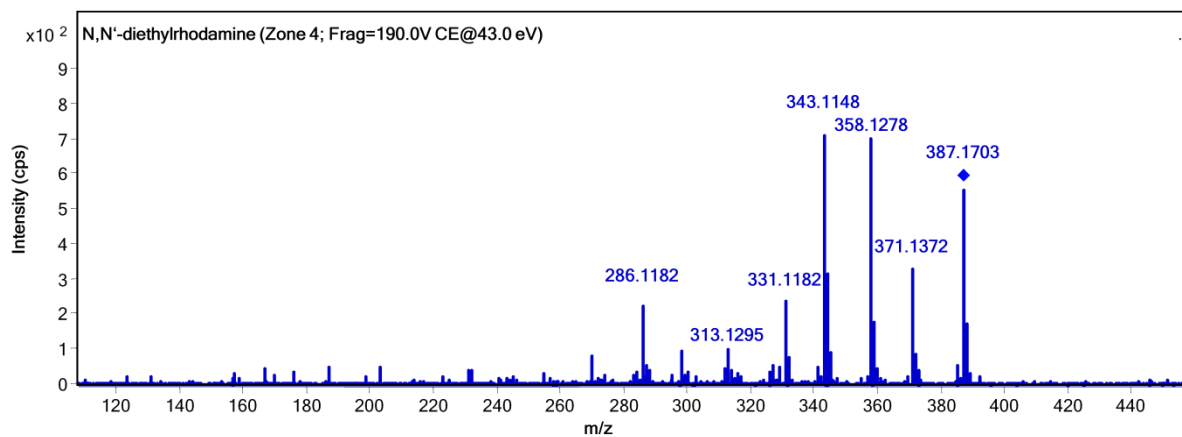


Figure 8: MS/MS spectrum of N,N'-diethylrhodamine (HPTLC zone 4)

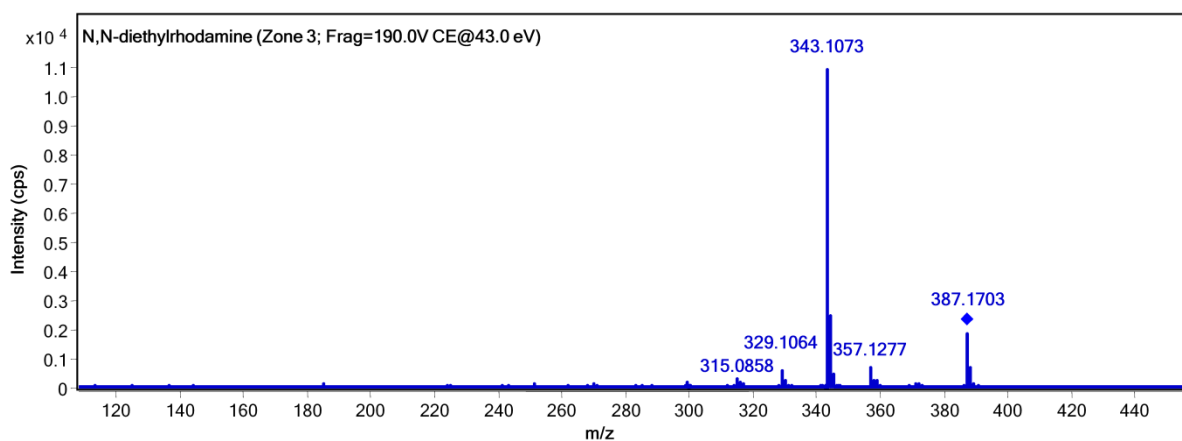


Figure 9: MS/MS spectrum of N,N-diethylrhodamine (HPTLC zone 3)

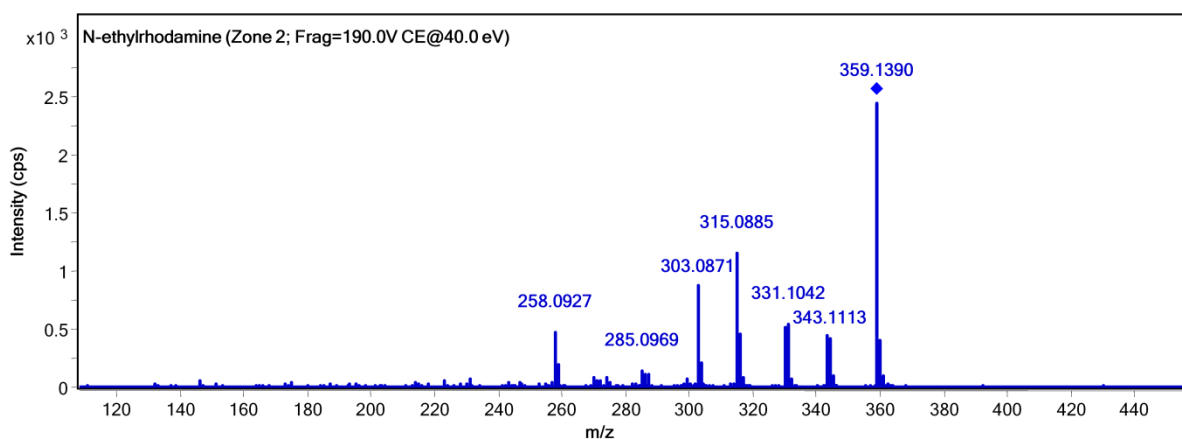


Figure 10: MS/MS spectrum of N-ethylrhodamine (HPTLC zone 2)

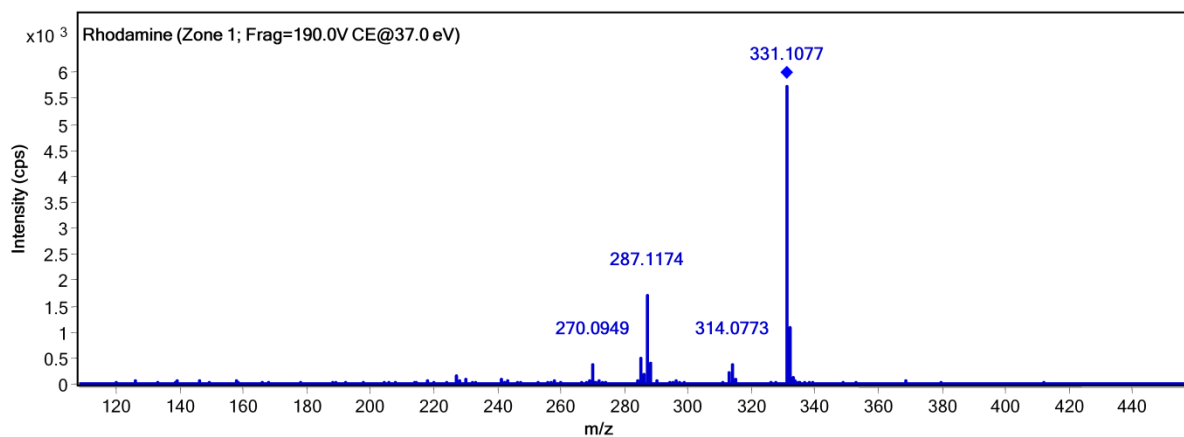


Figure 11: MS/MS spectrum of rhodamine (HPTLC zone 1)

Additional information of HPLC-MS/MS

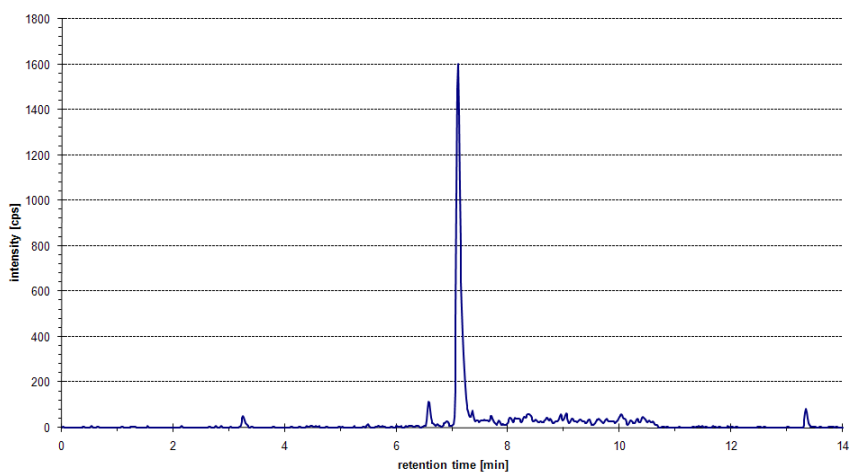


Figure 12: Mass transition for 10 ng/L rhodamin B standard: m/z 443.3 \Rightarrow 399.2 (Injection Volume: 50 μ l)

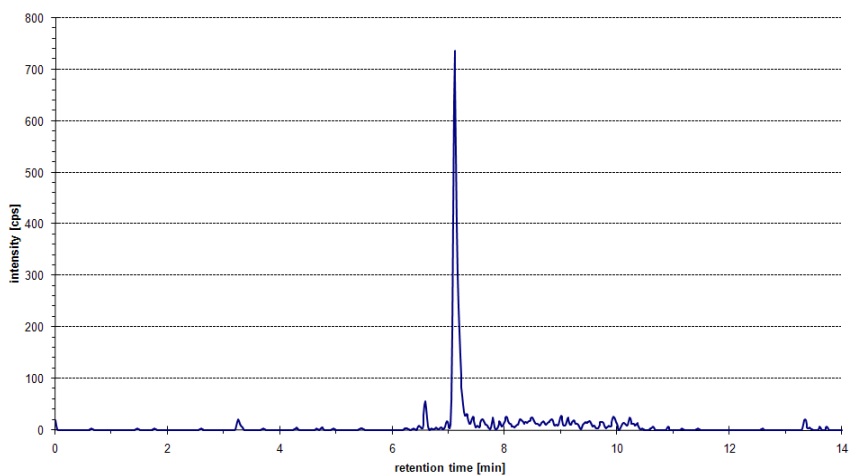


Figure 13: Mass transition for 10 ng/L rhodamin B standard: m/z 443.3 \Rightarrow 355.0 (Injection Volume: 50 μ l)

11.3.3 Publikation III

Müller, A., Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water, *Water Research* 46, 679 - 690, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.033.

Copyright Elsevier. Reproduced with permission.

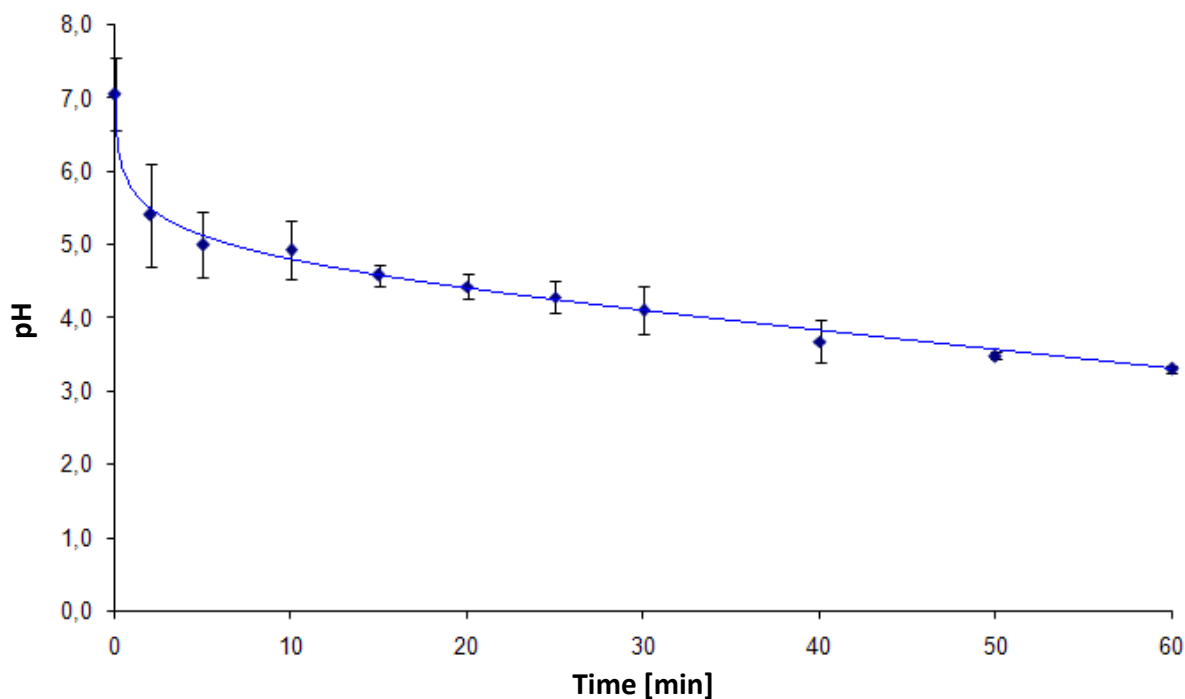
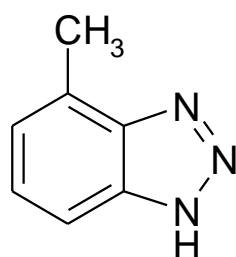
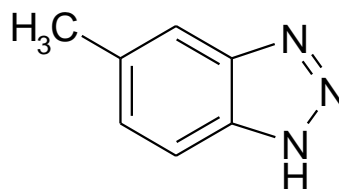


Figure S1: pH during ozonation experiment (4-methyl-1H-benzotriazole)



4-Methyl-1H-benzotriazole

Formula: $C_7H_7N_3$
Exact mass: 133.0640 u
[M-H]: 132.0567



5-Methyl-1H-benzotriazole

Formula: $C_7H_7N_3$
Exact mass: 133.0640 u
[M-H]: 132.0567

Figure S2: Structures of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole

Table S1: Optimized MS/MS settings (API 5000) and SPE recovery rates

MS/MS settings							SPE
Oxidation by-product	Precursor ion (Q1)	Product ion (Q3)	Dwell time [ms]	Declustering potential [eV]	Collision energy [eV]	Collision cell exit potential [eV]	Recovery rate [%]
133.0640 (C ₇ H ₇ N ₃) 4-MBT 5-MBT	132	103	25	-71	-35	-10	55
	132	88	25	-60	-50	-1	
M139 (C ₅ H ₅ N ₃ O ₂)	138	69	25	-80	-22	-5	30
	138	41	25	-80	-22	-5	
	138	50	25	-80	-22	-5	
147.0432 (C ₇ H ₅ N ₃ O) 1H-Benzotriazole-4-carbaldehyde/ 1H-Benzotriazole-5-carbaldehyde	146	118	25	-35	-22	-5	90
	146	90	25	-35	-28	-5	
	146	89	25	-35	-34	-13	
M165 (C ₇ H ₇ N ₃ O ₂)	164	137	25	-45	-18	-1	50
	164	109	25	-45	-22	-9	
	164	41	25	-45	-40	-3	

Table S2: HPTLC gradient

Step	Methanol (+0.05% formic acid) [Vol %]	Dichloromethane [Vol %]	Hexane [Vol %]	Migration [mm]	Drying time [min]
1	100.0	0.0	0.0	12.0	5.0
2	100.0	0.0	0.0	12.0	5.0
3	100.0	0.0	0.0	12.0	5.0
4	100.0	0.0	0.0	12.0	5.0
5	100.0	0.0	0.0	12.0	5.0
6	35.0	65.0	0.0	16.0	5.0
7	32.5	67.5	0.0	20.0	5.0
8	30.0	70.0	0.0	24.0	5.0
9	27.5	72.5	0.0	28.0	5.0
10	25.0	75.0	0.0	32.0	5.0
11	22.5	77.5	0.0	36.0	5.0
12	20.0	80.0	0.0	40.0	5.0
13	17.5	82.5	0.0	44.0	5.0
14	15.0	85.0	0.0	48.0	5.0
15	12.5	87.5	0.0	52.0	5.0
16	10.0	90.0	0.0	56.0	5.0
17	7.5	92.5	0.0	60.0	5.0
18	5.0	95.0	0.0	64.0	5.0
19	2.5	97.5	0.0	68.0	5.0
20	0.0	100.0	0.0	72.0	5.0
21	0.0	50.0	50.0	76.0	5.0
22	0.0	0.0	100.0	80.0	5.0

Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Schnelles Screening auf Reaktionsprodukte bei der Ozonung im Labormaßstab. *Vom Wasser* 109, 35-37.

Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Translated version

Rapid screening for ozonation reaction products on a laboratory scale

Müller, A.^{1,2}, Langenau/D, Schulz, W.¹, Langenau/D, Jung, N.¹, Langenau/D,

Ruck, W.K.L.², Lüneburg/D, Weber, W.H.¹, Langenau/D

Dr. Walter H. Weber,¹Zweckverband Landeswasserversorgung,
Betriebs- und Forschungslaboratorium, Am Spitzigen Berg 1, 89129 Langenau, Germany

²Leuphana Universität Lüneburg, Institut für Umweltchemie, Scharnhorststr. 1,
21335 Lüneburg, Germany

Introduction

The drinking water supply in Germany is generated mostly from ground and surface waters. The anthropogenic influences on these water sources are apparent from the presence of various organic trace substances. ^[1] In addition to pharmaceuticals and x-ray contrast media ^[2] as well as pesticides and their metabolites, ^[3] industrial chemicals such as the benzotriazoles ^[4] belong to the most frequently occurring anthropogenic trace compounds in the aquatic environment. Thus, it is essential that we examine their behavior during various water purification processes. Ozone, which is used in disinfection steps of this process, also oxidizes many organic trace compounds. Depending on the ozonation conditions (*e.g.*, ozone concentration, reaction time, or pH), this reaction can proceed through many different intermediary steps, up to the complete mineralization of the trace substances. ^[5] The resulting oxidation by-products may be relevant to drinking water,

as the example of the tolylfluorid metabolite dimethylsulfamide (DMS), which reacts with ozone to form N-nitrosodimethylamine, has clearly shown.^[6] Therefore, the identification of oxidation by-products is important for the evaluation of drinking water quality. Due to the low concentrations of such trace substances in water sources, we first conducted laboratory-scale experiments with markedly higher concentrations of the pollutants. The sample solutions were examined using enrichment-free liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry (*e.g.*, LC-QTOF-MS). The goal of the subsequent data analysis was to extract the oxidation by-products of the respective precursor compounds from the large number of other compounds detected.

Laboratory experiment

A schematic of the experimental reactor is shown in Figure S3. Before each experiment, ozone was pumped through the deionized water (950 mL) already present in the reactor. The ozone concentration in the reactor (adjustable up to 6 mg/L) was controlled by the power of the ozone generator, and was held constant during the experiment. Following addition of 100 mg of the precursor compound (in this case 4-methyl-1H-benzotriazole) diluted in 50 mL deionized water, samples were taken from the reactor after various reaction times and sodium thiosulfate was added to the samples to stop the reaction. A sample taken before addition of the precursor compound served as a blank.

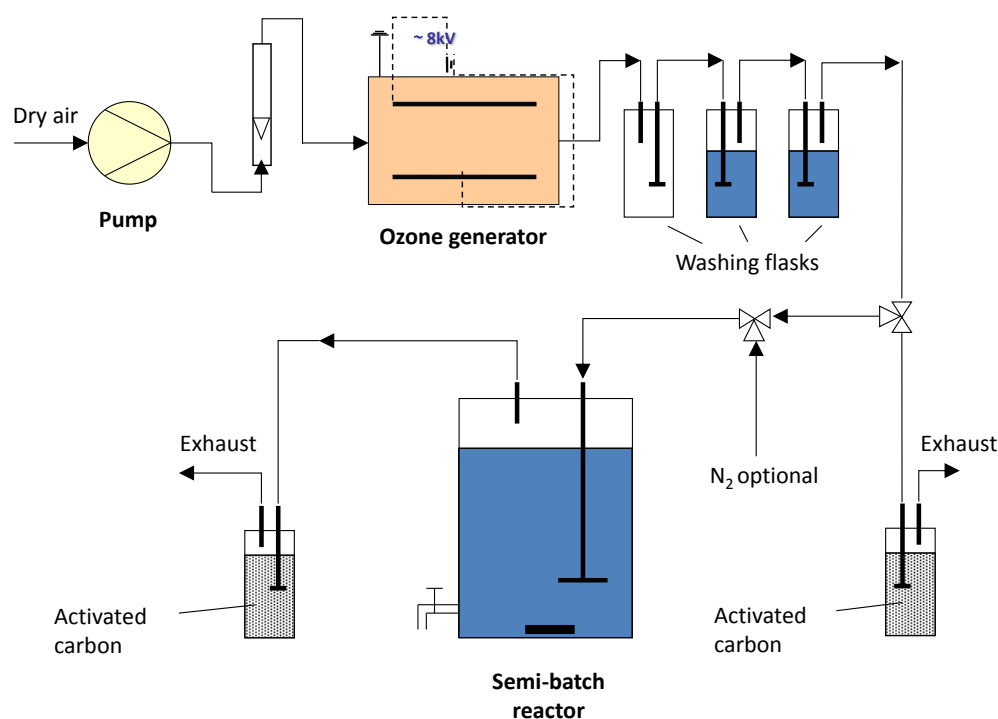


Figure S3: Schematic illustration of the experimental ozonation reactor^[7]

Analysis and evaluation

The water samples taken from the reactor after varying ozone-contact times were analyzed directly, without subsequent preparation, via LC-QTOF-MS in full scan mode over the mass range from m/z 35 to 1000. Figure S4A shows a representative contour plot of such data. A complete mass spectrum (1 Scan/s) was generated for each retention time. The abundances of the detected masses are indicated by various colors. Figure S4B shows a magnification of a section of the contour plot. The course of the abundance is clearly visible as a peak-shaped curve on both the time- and mass axes. Features were extracted using specific computer algorithms (*e.g.*, Molecular Feature Extractor[®]). For statistical confidence, identified features were only accepted as ‘detected’ when they were present in three replications of a given sample, which is especially recommended for features with low concentrations. Depending on the software used and the chosen parameter settings, various features could be identified as either isotopes or additional molecular adducts based on their mass differences and were identified as belonging to a given compound.

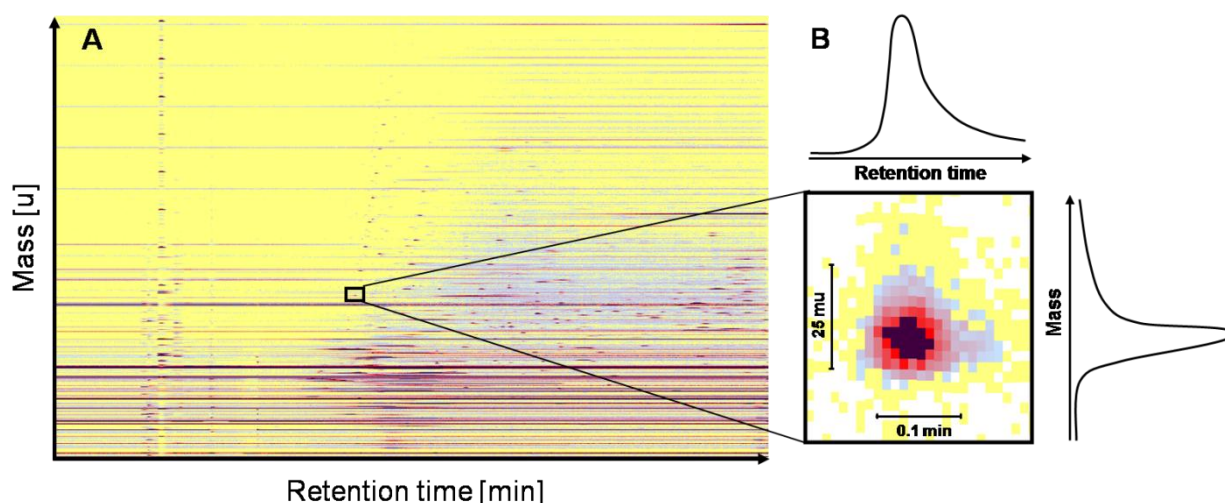


Figure S4: Contour plot of a entire dataset (A) and the magnification of one feature (B)

Evaluation of the full scan datasets results in a list of compounds for each sample, consisting of several hundred entries with exact masses, retention times, and abundances. To extract compounds that might be possible reaction products, plots of abundance vs. reaction time were examined. Rapid assessments of the course of the abundance were conducted using so-called ‘heat maps.’ The components of a given sample were represented as two-dimensional matrices (Figure S5) within which the standardized signal intensity (abundance) was color-coded. Based on the colored time course of each component over the ozone reaction time, possible reaction products (degradation, intermediate, and formation kinetics) were rapidly identified from a multitude of components. The characteristic time course for an intermediate product is shown in Figure S5 for the component with a mass of 153.0538 u; by contrast, the component with a mass

of 155.0331 u illustrates the formation kinetics of a reaction product. The abundance time course for the mass 133.0640 u indicates the degradation kinetics of the 4-methyl-1H-benzotriazol.

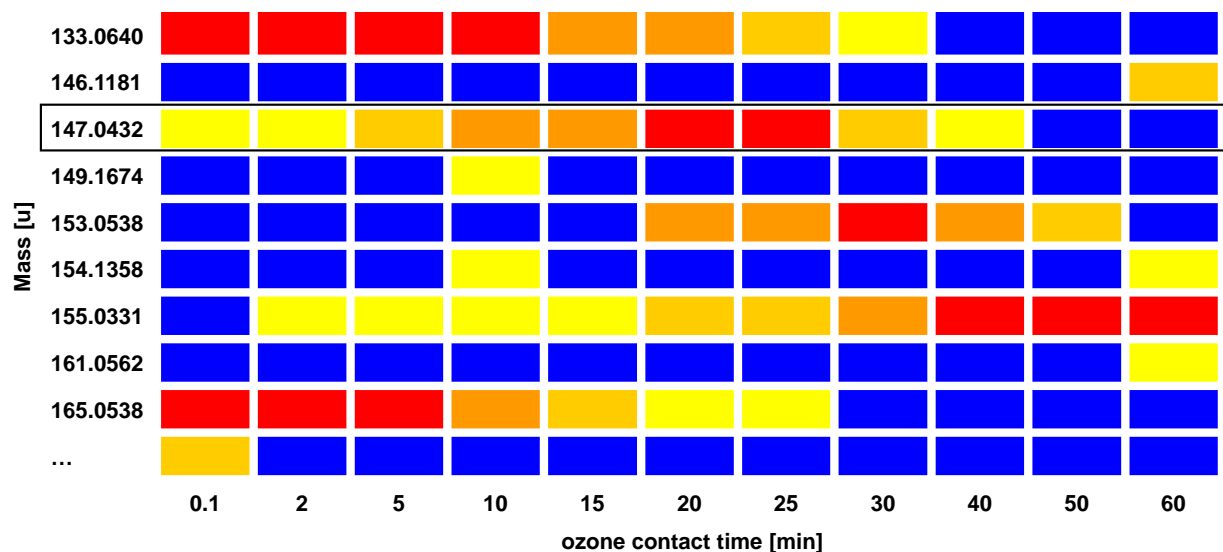


Figure S5: A portion of the heat map (red = high abundance, yellow or blue = little or no abundance)

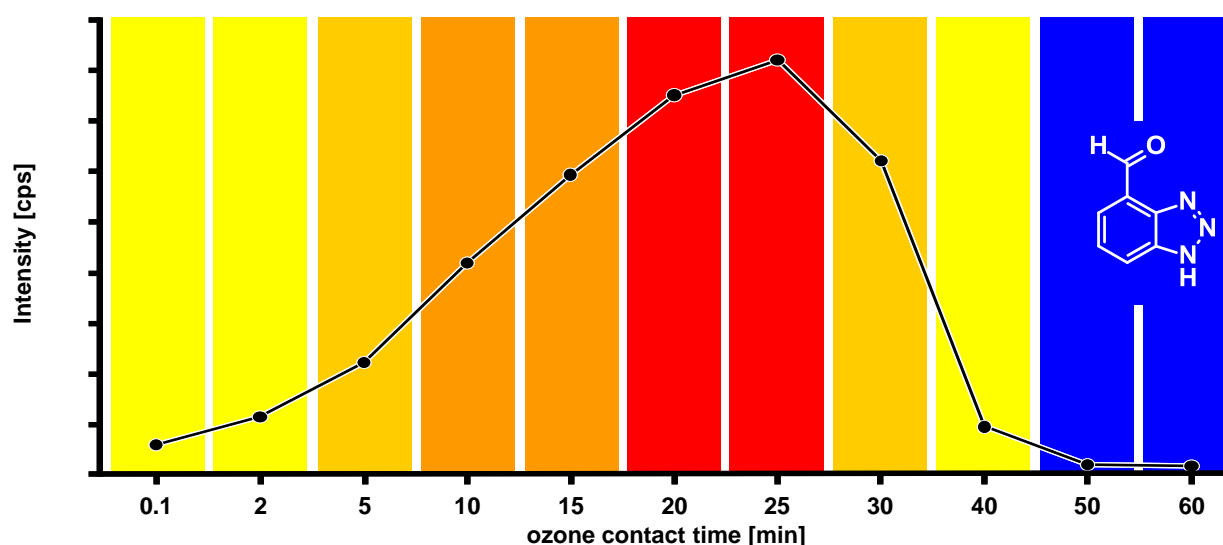


Figure S6: Abundance time course for the components with a mass of 147.0432 u (red = high abundance, yellow or blue = little or no abundance)

To better illustrate the heat map, Figure S6 shows an example based on the mass 147.0432 u (outlined in Figure S5); whereby, each ozone reaction time is represented by a given color-coded level. Based on the exact masses and the isotope patterns of the components, it is possible to compute proposed molecular formulas. Insights into these structures can be obtained, for example, from MS^n spectra, hydrogen/deuterium exchange experiments, and with the help of specific derivatization reactions. Figure S6 shows such a proposed molecular formula for the component with mass 147.0432 u (1H-benzotriazole-4-carbaldehyde).

Conclusions and future outlook

The approach described here enables a rapid screening for relevant reaction products occurring during laboratory-scale ozonation. Via the use of heat maps, relevant compounds can be rapidly identified based on their color-coded abundance time courses. This approach can also serve as an effective aid in the evaluation of LC-MS chromatograms, especially for non-target screening and can be applied to other questions, such as the monitoring of surface water, as well. For example, Figure S7 shows a portion of a heat map generated from the LC-QTOF-MS measurements from a 12-hour mixed sample of surface water over a period of seven days. A nearly constant contamination from a component with a mass of 273.1934 u and a retention time of 8.1 min is clearly visible. By contrast, the component with a mass of 270.1769 u and a retention time of 10.5 min appears only after the fourth day and the one with mass 272.0904 u and retention time of 12.2 min occurs only transiently on day five.

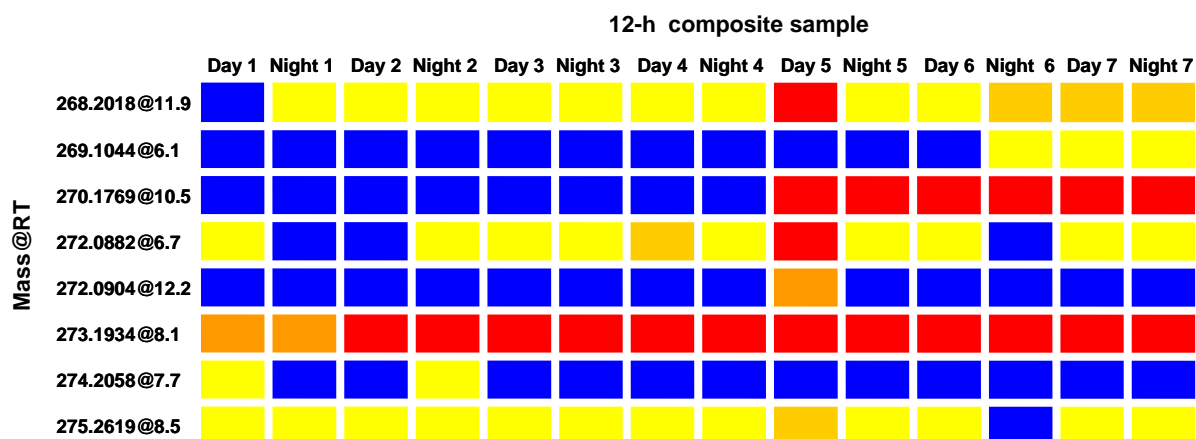


Figure S7: A portion of the heat map from 12-hour mixed samples of a surface water monitoring. (red = high abundance, yellow = low abundance, and blue = none)

Literatur:

- [1] C.G. Daughton, T.A. Ternes, *Environmental Health Perspectives* **1999**, 107, 907-944.
- [2] S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, *Environ. Int.* **2009**, 35 (5), 803-814.
- [3] J.V. Sancho, Ó.J. Pozo, M. Ibáñez, F. Hernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386 (4), 987-997.
- [4] W.H. Weber, A. Müller, S.C. Weiss, W. Seitz, W. Schulz, *Vom Wasser* **2009**, 107 (4), 16-24.
- [5] T.C. Schmidt, H. Lutze, W. Merkel, *Vom Wasser* **2010**, 108 (2), 41-47.
- [6] C.K. Schmidt, H.-J. Brauch, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42 (17), 6340-6346.
- [7] W. Seitz, *Dissertation* **2007**, University of Surrey, UK.

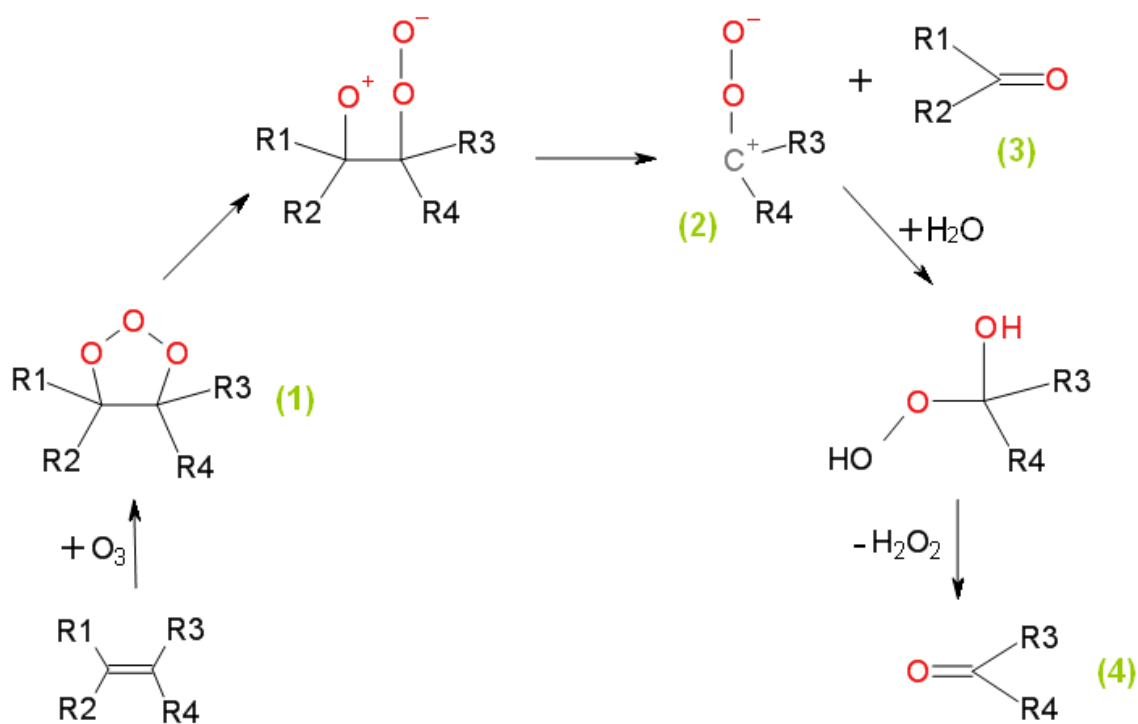


Figure S8: Ozone addition reaction based on the Criegee mechanism (von Gunten, 2003*)
 (1) ozonide (2) hydroxyhydroperoxide (3) carbonyl compound (4) carbonyl compound

* von Gunten, U. (2003) Ozonation of drinking water: Part I. Oxidation kinetics and product formation. *Water Research* 37(7), 1443-1467.

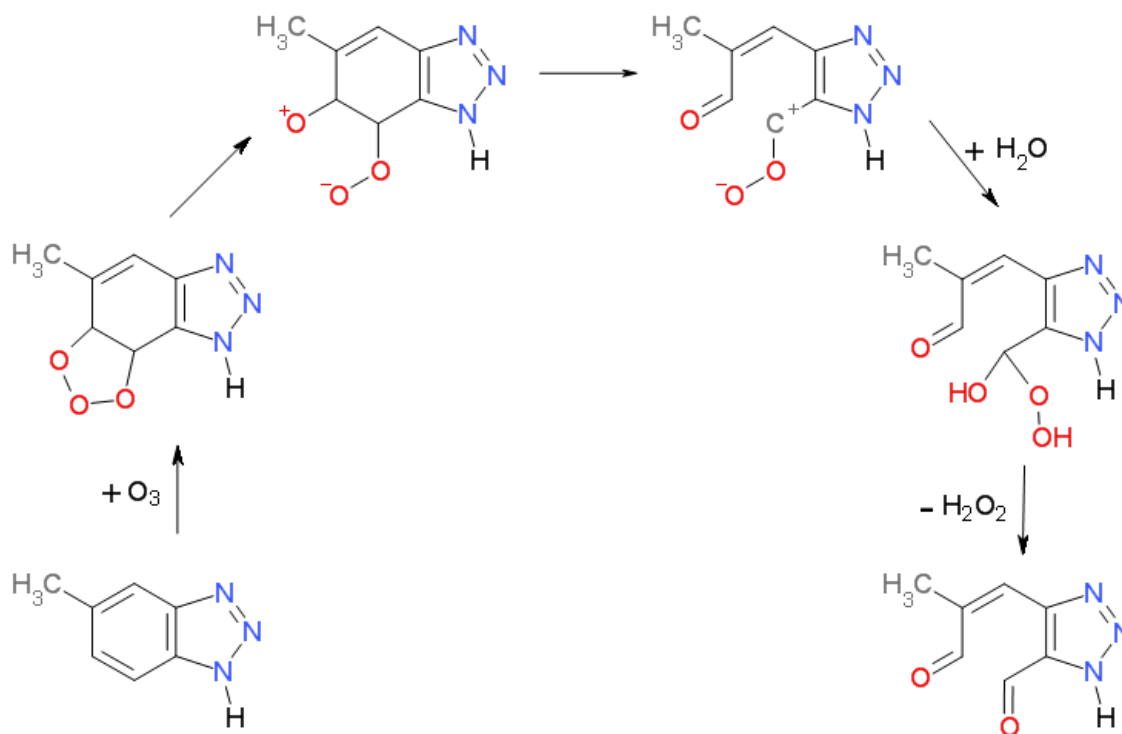
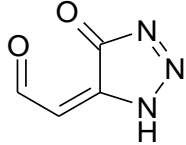
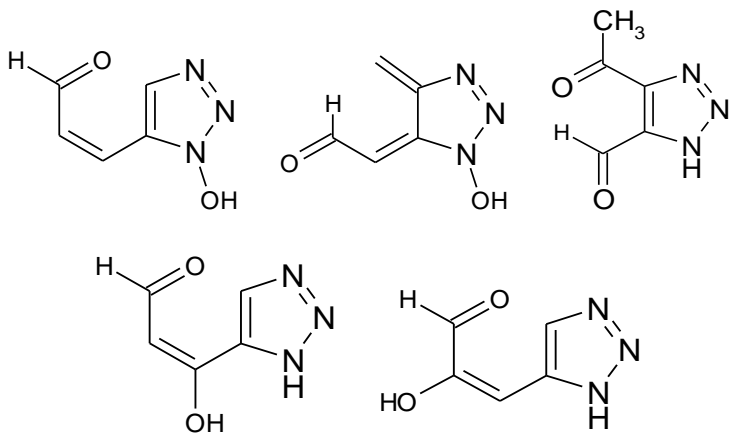
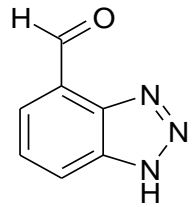
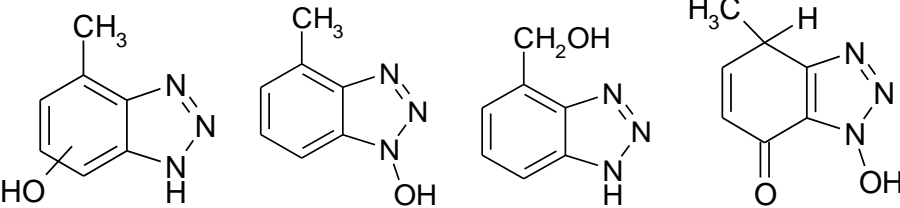
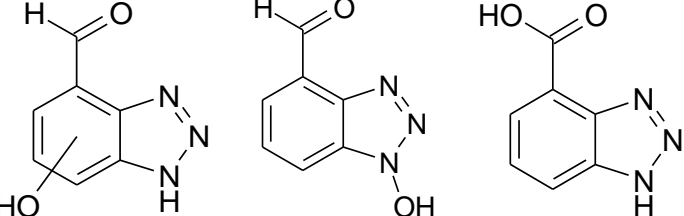
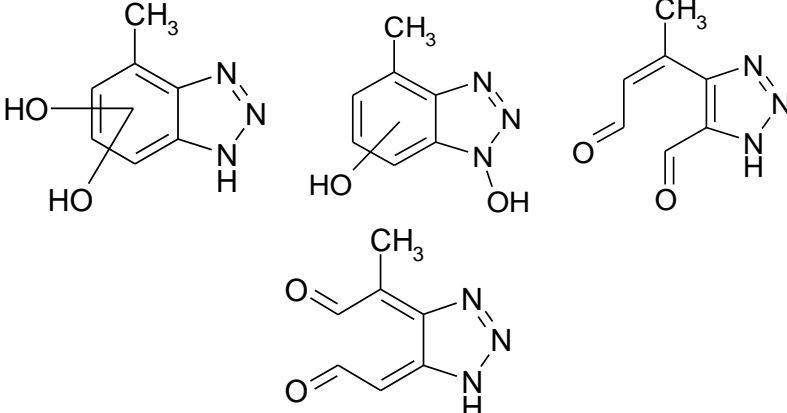
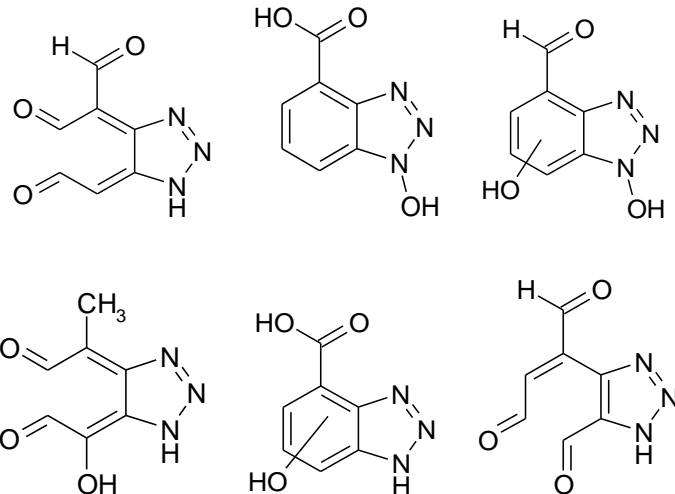
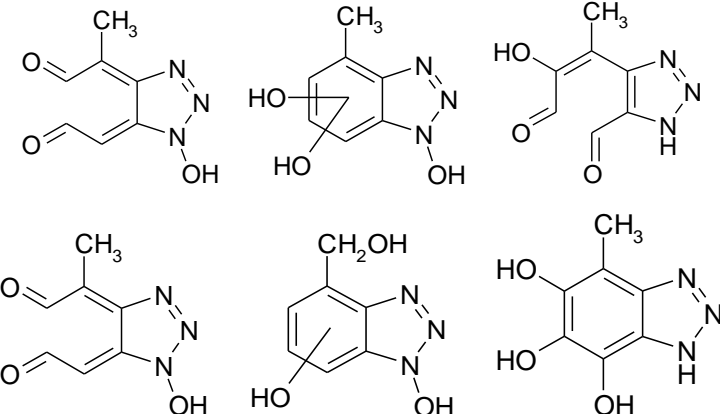


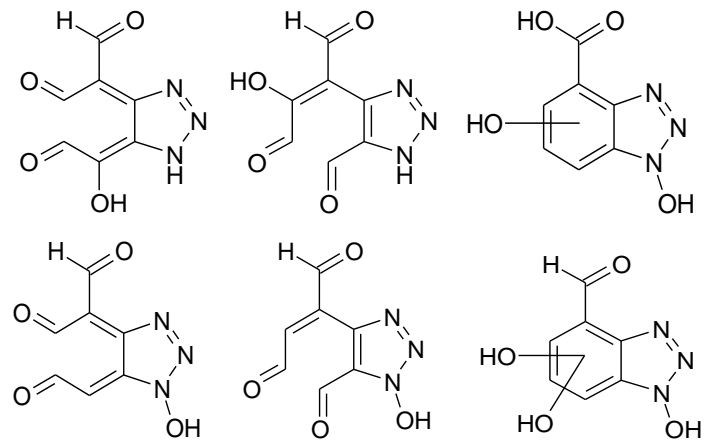
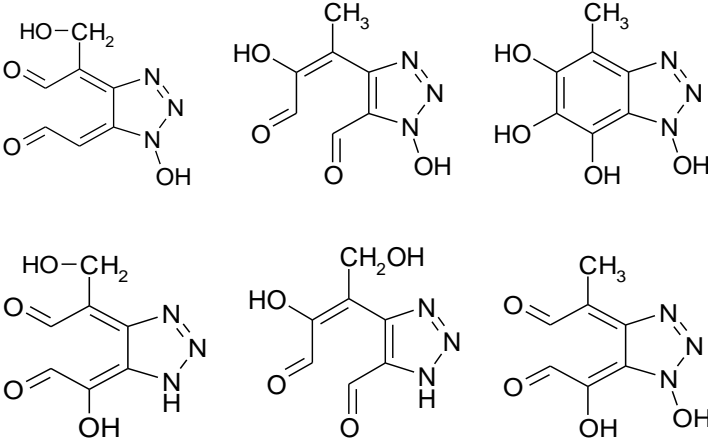
Figure S9: Criegee mechanism adapted to the 5-Methyl-1H-benzotriazole

Table S3: Postulated oxidation by-products of 4-methyl-1H-benzotriazole

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H] ⁻	Difference to 4-MBT
	C ₄ H ₃ N ₃ O ₂	125.0225	124.0152	+ 2 O - 3 C - 4 H
	C ₅ H ₅ N ₃ O ₂	139.0382	138.0309	+ 2 O - 2 C - 2 H
	C ₇ H ₅ N ₃ O	147.0432	146.0360	+ 1 O - 2 H

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H] ⁻	Difference to 4-MBT
	C ₇ H ₇ N ₃ O	149.0589	148.0516	+ 1 O
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂	163.0382	162.0309	+ 2 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂	165.0538	164.0466	+ 2 O

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 4-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₃	179.0331	178.0258	+ 3 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₃	181.0487	180.0415	+ 3 O

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 4-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₄	195.0280	194.0207	+ 4 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	197.0437	196.0364	+ 4 O

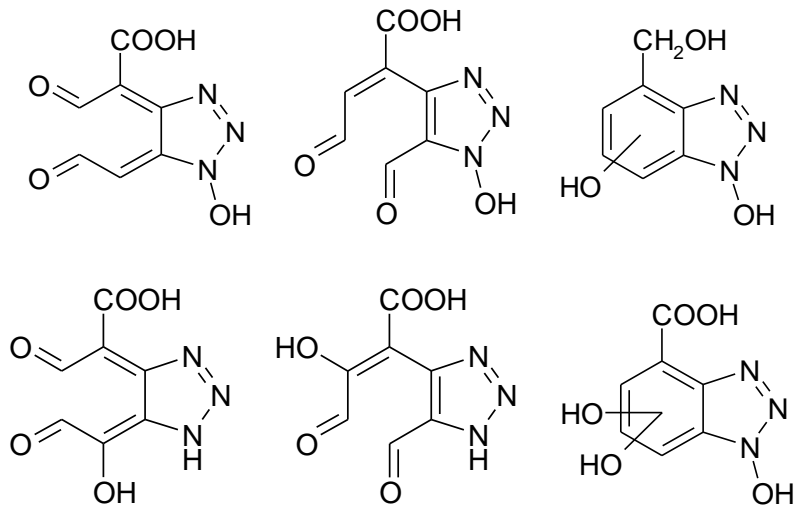
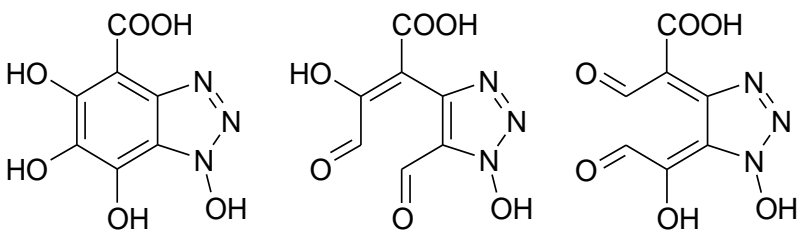
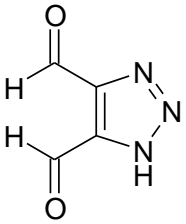
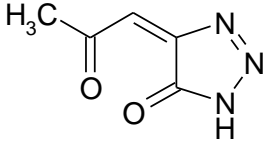
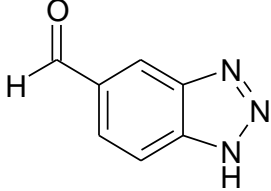
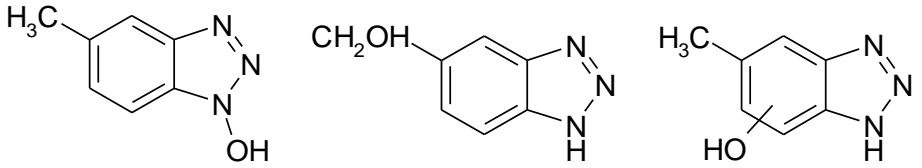
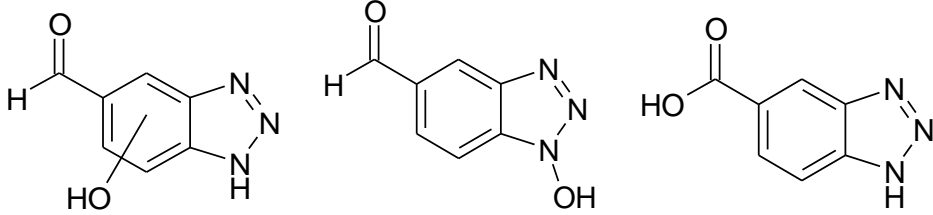
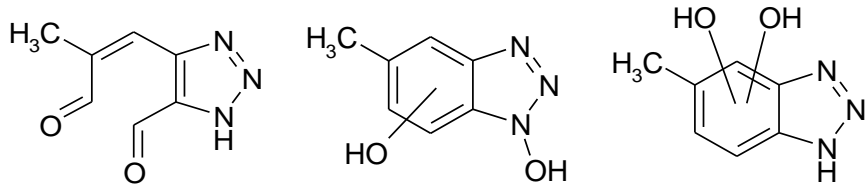
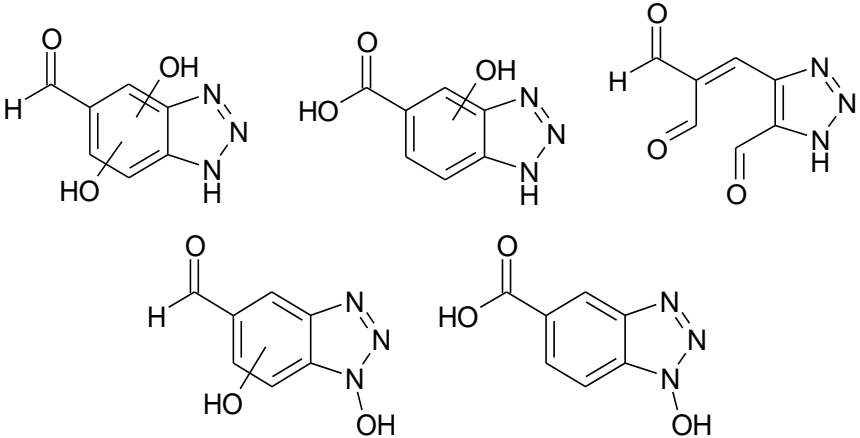
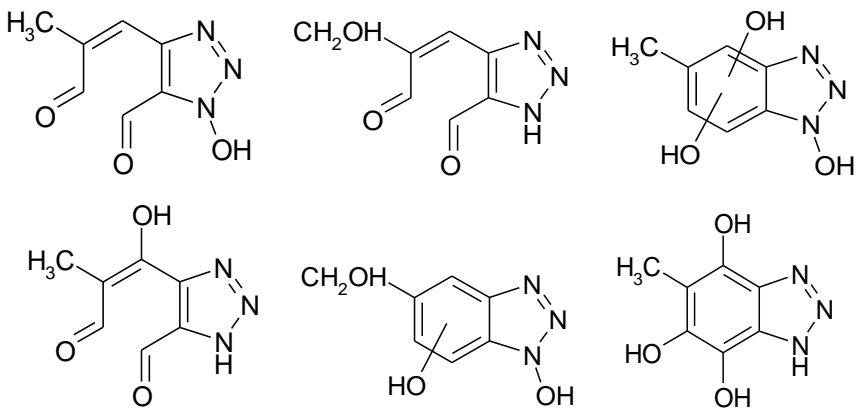
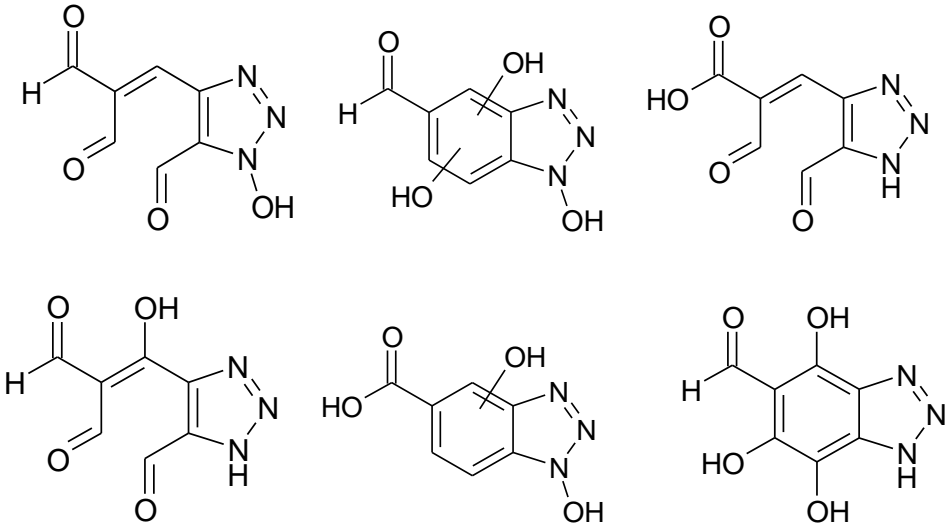
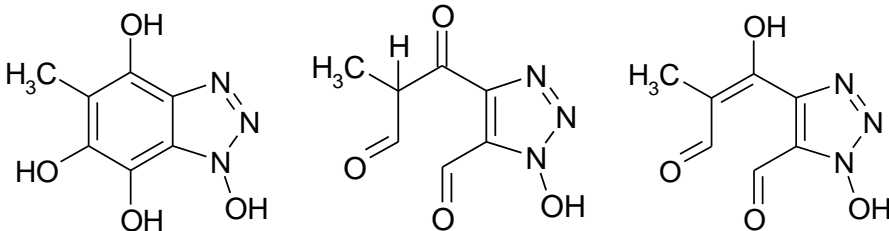
Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 4-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₅	211.0229	210.0156	+ 5 O - 2 H
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₆	227.0178	226.0106	+ 6 O - 2 H

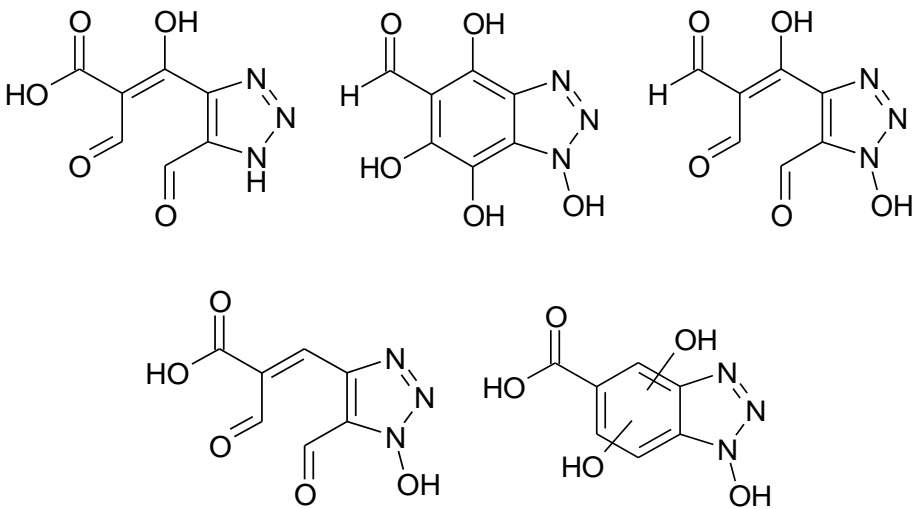
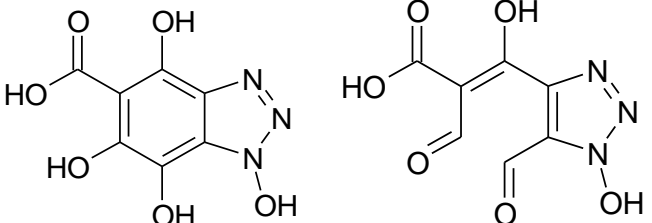
Table S4: Postulated oxidation by-products of 5-methyl-1H-benzotriazole

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 5-MBT
	$C_4H_3N_3O_2$	125.0225	124.0152	+ 2 O - 3 C - 4 H
	$C_5H_3N_3O_2$	139.0382	138.0309	+ 2 O - 2 C - 2 H
	$C_7H_5N_3O$	147,0432	146,0360	+ 1 O - 2 H

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 5-MBT
	C ₇ H ₇ N ₃ O	149,0589	148,0516	+ 1 O
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₂	163,0382	162,0309	+ 2 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂	165,0538	164,0466	+ 2 O

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 5-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₃	179,0331	178,0258	+ 3 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₃	181,0487	180,0415	+ 3 O

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 5-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₄	195,0280	194,0207	+ 4 O - 2 H
	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	197,0437	196,0364	+ 4 O

Postulated oxidation by-products	Formula	Calculated mass M	[M-H]-	Difference to 5-MBT
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₅	211,0229	210,0156	+ 5 O - 2 H
	C ₇ H ₅ N ₃ O ₆	227,0178	226,0106	+ 6 O - 2 H

11.4 Publikationsverzeichnis

Referierte internationale Fachzeitschriften

1. Müller, A., Flottmann, D., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., 2007. Alternative validation of a LC-MS/MS-multi-method for pesticides in drinking water. *Clean Air, Water and Soil* 35, 329-338, DOI: 10.1002/clen.200700014.
2. Müller, A., Flottmann, D., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., 2008. Assessment of Robustness for a LC-MS/MS-Multi-Method by the Response Surface Methodology and its sensitivity. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 390, 1317-1326, DOI: 10.1007/s00216-007-1793-y.
3. Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W., Albert, A., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24, 659-666, DOI:10.1002/rcm.4430.
4. Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A New Approach to Data Evaluation in the Non-Target Screening of Organic Trace Substances in Water Analysis. *Chemosphere* 85, 1211-1219, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.07.009.
5. Müller, A. Weiss, S.C., Beißwenger, J., Leukhardt, H.G., Schulz, W., Seitz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2012. Identification of ozonation by-products of 4- and 5-methyl-1H-benzotriazole during the treatment of surface water to drinking water. *Water Research* 46, 679 - 690, DOI: 10.1016/j.watres.2011.11.033.
6. Posch, T.N., Müller, A., Schulz, W., Pütz, M., Huhn, C., 2012. Revealing the Separation Mechanism and the Influence of the Background Electrolytes on Detection in Non-Aqueous Capillary Electrophoresis - Mass spectrometry using a DOE. *Electrophoresis*, accepted.

Referierte nationale Fachzeitschriften

7. Lucke, T., Seitz, W., Schulz, W., Müller, A., Weber, W. H., 2008. Aktivkohle zur Entfernung von Arzneimittelrückständen bei der Abwasserbehandlung - Ergebnisse eines Pilotvorhabens. *Vom Wasser* 106, 7-15.
8. Weber, W.H., Müller, A., Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2009. 1H-Benzotriazol und Tolyltriazole in der aquatischen Umwelt Vorkommen in Grund-, Oberflächen- und Abwasser im Gebiet Donauried-Hürbe. *Vom Wasser* 107, 16-24.
9. Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Schnelles Screening auf Ozonungsprodukte in Laborversuchen. *Vom Wasser* 108, 35-37.

Nicht referierte internationale und nationale Fachzeitschriften

10. Flottman, D., Müller, A., Schulz, W., 2006. Von der univariaten zur multivariaten Datenanalyse (Teil 1). *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 57, 332-337.
11. Flottman, D., Müller, A., Schulz, W., 2006. Von der univariaten zur multivariaten Datenanalyse (Teil 2). *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 57, 466-471.
12. Flottman, D., Müller, A., Schulz, W., 2007. Von der univariaten zur multivariaten Datenanalyse (Teil 3). *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 58, 48-53.
13. Müller, A., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., Flottmann, D., 2007. Statistische Versuchsplanung- Abschätzung der Robustheit und Optimierung einer LC-MS/MS-Multi-Methode. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 51, 820-823.
14. Müller, A., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., Berset, J.D., 2008. Massenspektrometrie in der Wasseranalytik - Screening nach TNT-Umwandlungsprodukten in Wasser. *GIT Labor-Fachzeitschrift* 52, 899-902.
15. Weber, W.H., Müller, A., Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2010. Benzotriazole in der aquatischen Umwelt - Multidimensionales Screening mittels HPTLC/AMD und Nano-HPLC/QTOF-MS. *GIT Spezial Separation* 30, 26-28.
16. Weber, W.H., Müller, A., Weiss, S.C., Seitz, W., Schulz, W., 2010. 1H-Benzotriazole and tolyltriazole in the aquatic environment. *CBS Camag Bibliography Service* 105, 7-9.

Vorträge

Referent ist unterstrichen

17. Müller, A., Flottmann, D., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., 2007. Anwendung der statistischen Versuchsplanung bei der Validierung von LC-MS-Multimethoden. Langenauer Wasserforum, 05. - 06. November.
18. Schulz, W., Müller, A., 2008. Identifizierung und Quantifizierung organischer Spurenverunreinigungen und deren Metaboliten in Grund-, Oberflächen- und Trinkwasser mittels nano-LC Q-TOF und Chip-Technologie. Agilent QQQ-/QTOF-Anwendertreffen, Waldbronn, 08. - 09. April.
19. Schulz, W., Taichrib, A., Müller, A., Seitz, W., Weber, W.H., 2008. Identifizierung von organischen Spurenstoffen in Wasser durch Non-Target-Screening mittels Nano-LC und Q-TOF. 74. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Trier, 28. - 30. April.
20. Müller, A., Schulz, W., 2008. Konzept des Non-Target-Screenings für organische Spurenstoffe in Wasser. Leuphana Universität Lüneburg, 24. Juni.
21. Schulz, W., Müller, A., 2008. Non-Target-Screening - Tools and Workflow (small molecules in the aquatic environment). Meeting Agilent, Santa Clara, 04. - 05. August.
22. Müller, A., Weber, W.H., 2008. Identifizierung von Markierungsfarbstoffen und deren Metaboliten in Grundwasser mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS nach HPTLC/AMD. Langenauer Wasserforum, 03. - 04. November.
23. Müller, A., 2009. Nachweis von Metaboliten in der aquatischen Umwelt mittels Dünnschichtchromatographie in Kombination mit Nano-Chip-LC/QTOF-MS am Beispiel einer gefärbten Grundwasserprobe. 19. Doktorandenseminar, Hohenroda, 11. - 13. Januar.
24. Müller, A., Schulz, W., 2009. Non-Target-Screening von Wasserproben - Die Suche nach dem Unbekannten. Festkolloquium zum 60. Geburtstag von Professor Dr. Wolfgang Ruck, Leuphana Universität Lüneburg, 30. Januar.
25. Schulz, W., Müller, A., Weber, W.H., 2009. Non-Target-Screening mittels LC-Q-TOF in der Wasseranalytik - Gegenwart und Zukunft. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Konstanz, 10. März.
26. Schulz, W., Weiss, S.C., Müller, A., Albert, R., Seitz, W., Weber W.H., 2009. Einsatz der HPTLC-MS Kopplung zur Identifizierung organischer Spurenstoffe in Roh- und Trinkwasser,

- Neuer Weg zur TLC/HPTLC-MS Kopplung. Camag Analytischer Fortbildungstag, Langenau 26. März, Offenburg 30. April, Münster 26. Juni, Wien 24. September und Berlin 1. Oktober.
27. Schulz, W., Müller, A., Weber, W.H., 2009. Screening nach Metaboliten organischer Spurenverunreinigungen in der aquatischen Umwelt mittels LC-MS. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund, 18. - 20. Mai.
28. Schulz, W., Müller, A., Weber, W.H., 2009. Lösungsansätze für die Identifizierung organischer Spurenstoffe in der aquatischen Umwelt, Langenauer Wasserforum, 09. - 10. November.
29. Müller, A., Schulz, W., 2009. DAIOS-Online - Concept of a data base for the LC-MS-screening. Analytical Forum „Water Contaminants“, Langenau, 11. November.
30. Schulz, W., Müller, A., Weber, W.H., 2009. Organische Spurenstoffe in Wasser erkennen und identifizieren - Welche Möglichkeiten bietet das QTOF-MS. Agilent Anwendertreffen Massenspektrometrie, Würzburg, 07. - 08. Dezember.
31. Jobelius, C., Frimmel, F.H., Müller, A., Schulz, W., Zwiener, C., 2010. Metaboliten-Screening und Identifizierung mit Neutral-Loss Scans und akkurater Massenbestimmung. Doktorandenseminar, Hohenroda, 09. - 12. Januar.
32. Weiss, S. C., Müller, A., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W. H., 2010. Anwendung moderner Analysenmethoden zur Ermittlung des Verhaltens organischer Spurenstoffe bei der Trinkwasseraufbereitung. Analytica 2010, München, 23. März.
33. Schulz, W., Weiss, S.C., Müller, A., Albert, R., Seitz, W., Weber, W.H., 2010. Einsatz der HPTLC-MS Kopplung zur Identifizierung organischer Spurenstoffe in Roh- und Trinkwasser. Neuer Weg zur TLC/HPTLC-MS Kopplung. Camag Analytischer Fortbildungstag, Oldenburg 16. April, Leiden 3. Juni und Gent 4. Juni.
34. Glauner, T., Hopley, C., Müller, A., Jung, N., Schulz, W., 2010. Application of the Q-TOF to the screening of food and environmental samples (Non-target screening - Identification of waterworks relevant contaminants in landfill leachate). Environmental & Food MS user meeting, Windsor, 15 - 17. September.
35. Weiss, S.C., Schulz, W., Müller, A., Albert, R., Seitz, W., Weber, W.H., 2010. Application of HPTLC-MS for the identification of organic trace substances in raw and drinking water. HET Instruments, Amsterdam, 29. September.

36. Schulz, W., Weiss, S.C., Müller, A., Weber, W.H., 2011. Application of Non-Target Screening in Drinking Water Production - Multidimensional - Effect Directed - Non-Target Analysis. International Conference on Chemistry and the Environment, Zürich, 11. September.

Poster

37. Müller, A., Schulz, W., Seitz, W., Flottmann, D., Weber, W. H., 2007. Application of statistical design to optimize the validation. ANAKON, Jena, 27. - 30. März.
38. Müller, A., Schulz, W., Seitz, W., Flottmann, D., Weber, W. H., 2007. Validierung einer LC-MS/MS-Methode für Pestizide in Trinkwasser mittels Response Surface Methodology (RSM). 73. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Passau, 14. - 16. Mai.
39. Müller, A., Seitz, W., Schulz, W., Weber, W. H., Schleuder, D., Stahl-Zeng, J., 2008. Vergleich verschiedener Quantifizierungsmodelle in der LC-MS/MS-Analytik organischer Spurenstoffe in Wasser. 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, Gießen, 2. - 5. März.
40. Müller, A., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W. H., Flottmann, D., 2008. Optimierung der ESI-Bedingungen bei der anreicherungs-freien LC-MS/MS-Bestimmung von Spurenverunreinigungen in Wasser mittels der Response Surface Methodologie. 74. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Trier, 28. - 30. April.
41. Holzinger, D., Seitz, W., Müller, A., Schulz, W., Weber, W. H., 2008. Matrixeinflüsse bei der anreicherungs-freien LC-MS-Analytik von Wasser mit Elektrospray-Ionisation. 74. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Trier, 28. - 30. April.
42. Weiß, S., Müller, A., Albert, R., Schulz, W., Weber, W.H., 2008. Identifizierung von Farbstoff-Tracern und deren Metaboliten nach HPTLC/AMD und Nano-Chip-LC/QTOF-MS. Langenauer Wasserforum, 03. - 04. November.
43. Müller, A., Schulz, W., Weber, W.H., 2008. Nachweis von TMDD in Oberflächengewässern mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS. Langenauer Wasserforum, 03. - 04. November.
44. Müller, A., Schulz, W., Weber, W.H., 2008. Non-Target-Screening am Beispiel einer Grundwasserprobe. Langenauer Wasserforum, 03. - 04. November.

45. Müller, A., Schulz, W., Weber, W.H., Müller, M., 2008. Database Assisted Identification of Organic Substances (DAIOS) - Eine Online-Datenbank für die aquatische Umwelt. Langenauer Wasserforum, 03. - 04. November.
46. Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Weber, 2009. Identifizierung von Markierungsfarbstoffen und deren Metaboliten in Grundwasser mittels Nano-Chip-LC/QTOF-MS nach HPTLC-AMD. 75. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund, 18. - 20. Mai.
47. Müller, A., Schulz, W., Weber, W.H., Müller, M., 2009. Database Assisted Identification of Organic Substances (DAIOS) - Eine Online-Datenbank für die aquatische Umwelt. 75. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund, 18. - 20. Mai.
48. Jung, N., Weiß, S.C., Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2009. Einsatz von Datenbanken zur Auswertung des HPTLC/AMD-Fingerprints und zur Substanzidentifikation mittels Massenspektrometrie. Langenauer Wasserforum, 09. - 10. November.
49. Weiß, S.C., Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2009. Anwendung der HPTLC/AMD in Kombination mit der LC-MS zur Identifizierung von organischen Spurenstoffen in Kunstrasen-Eluaten. Langenauer Wasserforum, 09. - 10. November.
50. Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2009. Datenbank-unterstützte massenspektrometrische Identifizierung mittels LC-MS/QTOF von 2-Naphthol und dessen Abbauprodukten. Langenauer Wasserforum, 09. - 10. November.
51. Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Einsatz des Non-Target-Screenings zur Erkennung von Spurenstoffeinträgen in das Rohwasser einer Trinkwasserversorgung. 76. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Bayreuth, 10. - 12. Mai.
52. Müller, A., Jung, N., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Neuer Ansatz der Datenauswertung für das Non-Target-Screening. 7. Langenauer Wasserforum, Langenau, 8. - 9. November.
53. Schulz, W., Müller, A., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2010. Screening nach Reaktionsprodukten bei der Ozonung mit Hilfe der Mass Profiler Professional[®] Software. 7. Langenauer Wasserforum, Langenau, 8. - 9. November.
54. Posch, T.N., Pütz, M., Schulz, W., Müller, A., Huhn, C., 2011. Forensic Analysis of Biogenic Recreational Drugs by Non-Aqueous Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry. ANAKON, Zürich, 22. - 25. März.

-
55. Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Schnelles Screening auf Ozonungsprodukte in Laborversuchen. 77. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Norderney, 29.Mai - 01. Juni.
56. Posch, T.N., Roscher, J., Müller, A., Schulz, W., Pütz, M., Huhn, C., 2011. Method Optimization by Design of Experiments in Non-Aqueous Capillary Electrophoresis - Mass Spectrometry of Biogenic Drugs. 18th International Symposium on Electro-and Liquid Phase-separation Techniques (ITP 2011), Tbilisi, Georgia, 28. - 31 August.
57. Müller, A., Schulz, W., Jung, N., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. Schnelles Screening auf Ozonungsprodukte in Laborversuchen. 8. Langenauer Wasserforum, Langenau, 7. - 8. November.

11.5 Lebenslauf

Alexander Müller
Gartenstraße 9
88433 Alberweiler

geboren am 19.08.1980 in Biberach an der Riß
Staatsangehörigkeit: deutsch

Beruflicher Werdegang

- Seit Jan 2012 *Vetter Pharma-Fertigung GmbH & Co. KG Ravensburg*
Mitarbeiter Prozessimplementierung in der Abteilung Development Services
Evaluierung und Überführung von neuen Technologien und Prozessen in der Produktion sowie Implementierung, Prüfung, Beurteilung und Abklärung des pharmazeutischen Prozesses unter Einhaltung von GMP und Behördenanforderungen.
- Juli 2007 - Juni 2011 *Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau*
Labormitarbeiter/Doktorand
Betriebs- und Forschungslaboratorium; Bearbeitung von Forschungsprojekten und Auftragsanalytik sowie die Erarbeitung der Dissertation „Strategien für das Screening und die Identifizierung von organischen Spurenstoffen in Wasser mittels HPLC-QTOF-MS“ in Kooperation mit der Universität Leuphana Lüneburg.
- Feb 2007 - Mai 2007 *Renesas Semiconductor Europe GmbH Landshut.*
Werksstudent
Manufacturing Engineering; Vorbereiten von Unterlagen für eine Statistik-Schulung (Design of Experiments, DOE) von Ingenieuren, Durchführung des Trainings und Unterstützung bei der Anwendung und Auswertung der statistischen Versuchsplanung für Prozesse in der Produktion.

Okt 2006 - Jan 2007 *Hochschule Aalen*

Wissenschaftlicher Assistent

Fachbereich Chemie; Vorbereiten von Vorlesungen und Erstellen von Veröffentlichungen.

März 2006 - Sept 2006 *Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau*

Diplomarbeit

Betriebs- und Forschungslaboratorium; „Validierung einer Multimethode der LC-MS auf herkömmlichem und alternativem Weg“, Anwendung von statistischen Verfahren (DOE und Response Surface Methodology, RSM) zur effektiven und schnellen Methodvalidierung.

März 2004 - Sept 2004 *DaimlerChrysler AG Stuttgart*

Praktikant

Mercedes Car Group - PKW - Motorenentwicklung - Team Abgas-Rollenprüfstände; Bestimmung von Stickstoffoxid (N₂O) in Autoabgasen mittels GC-ECD, weitere verwendete Analysensysteme: GC-MS und HPLC-UV.

Sept 2002 - Feb 2003 *Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG Biberach*

Praktikant

Abteilung Bio-Pharmazeutische Qualität & Entwicklung - Gruppe Verfahrensentwicklung Pharmazeutische Verfahren; Durchführung und Auswertung von Gefriertrocknungsverfahren im Labormaßstab.

Ausbildung

Juli 2007 - Nov 2012 *Universität Leuphana Lüneburg*

Dr. rer. nat., Institut für Umweltchemie

Okt 2001 - Sep 2006 *Hochschule Aalen.*

Dipl.-Ing. (FH), Chemie

Aug 1991 - Juli 2000 *Pestalozzi-Gymnasium Biberach*

Abitur

Alberweiler, 25. November 2012